

Ein implantierbares Abgabesystem für Nicotin
und seine Eignung zur Untersuchung von
chronischen Nicotinwirkungen im Tierversuch

vorgelegt von
Michael Horstmann
aus Essen
1982



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554825_0014

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
(Direktor: Prof. Dr. med. F.H. Kemper)

EIN IMPLANTIERBARES ABGABESYSTEM FÜR NICOTIN
UND SEINE EIGNUNG ZUR UNTERSUCHUNG VON
CHRONISCHEN NICOTINWIRKUNGEN IM TIERVERSUCH

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor rerum medicinalium
der Fachbereiche
5 Vorklinische und Theoretische Medizin und
6 Klinische Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Michael Horstmann
aus Essen
1982



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Prof. Dr. med. H.J. Kühle
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. K. Opitz
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. T. Eckert

Tag der mündlichen Prüfung: 8. März 1982

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Referent: Prof. Dr. med. K. Opitz

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. T. Eckert

Zusammenfassung

Horstmann, Michael

EIN IMPLANTIERBARES ABGABESYSTEM FÜR NICOTIN
UND SEINE EIGNUNG ZUR UNTERSUCHUNG VON CHRONISCHEN
NICOTINWIRKUNGEN IM TIERVERSUCH

Um chronische Wirkungen von Nicotin auf den Organismus zu untersuchen, bedarf es wegen der außerordentlich kurzen Wirkungsdauer dieses Alkaloids besonderer Systeme, die eine kontinuierliche Nicotinabgabe über 1 - 2 Wochen gewährleisten; ein solches implantierbares Nicotin-Abgabesystem wurde entwickelt und seine Funktion in vitro und in vivo geprüft.

In mehreren Versuchsreihen wurde der Einfluß des auf diese Weise kontinuierlich zugeführten Nicotins auf die Nahrungs- und Trinkwasseraufnahme, das Körpergewicht, die Körpertemperatur und das antinocizeptive Reflexverhalten von Ratten untersucht. Es zeigte sich eine Minderung der Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme und damit des Körpergewichts der Tiere. Die Körpertemperatur nahm ab, und die Reaktion auf einen definierten thermischen Reiz war verzögert.

Der zeitliche Ablauf der angeführten Parameter wurde sorgfältig analysiert. Ergebnis: Während die unter fort-dauernder Nicotineinwirkung allmählich wieder ansteigende Nahrungsaufnahme - zumindest teilweise - kompensatorischer Natur ist, entwickelte sich gegenüber der anti-diptischen, temperatursenkenden und antinocizeptiven Wirkung des Nicotins eine echte, zelluläre Toleranz.

Tag der mündlichen Prüfung: 8. März 1982

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Kontinuierlich freigebende Abgabesysteme (drug delivery systems)	7
2.1 Pharmakokinetische Bedeutung eines Abgabesystems nullter Ordnung für Nicotin	7
2.2 Möglichkeiten für die Konzeption von Abgabesystemen	14
3. Konzeption des Nicotinabgabesystems (NAS)	29
3.1 Beschreibung	29
3.2 Herstellung	29
3.3 Funktionsweise	34
3.4 Störeinflüsse	36
3.5 Möglichkeiten zur Beeinflussung der Abgaberate	40
4. In-vitro-Abgabeverhalten des NAS und einiger anderer Abgabesysteme	47
4.1 Beurteilung der Diffusionseigenschaften von Siliconschläuchen	47
- Inkubationsverfahren	52
4.2 Messung der Abgabe- und Dosiskonstanz der NAS in vitro	55
- Abgabekonstanz	55
- Dosiskonstanz	60
4.3 Temperaturabhängigkeit	63

	Seite
5. Kontinuierliche Nicotinabgabe im Tierversuch an der Ratte	65
5.1 Versuchsdurchführung	71
- Technik der Blutentnahme	75
- Berauchung	76
5.2 Meßverfahren zur Bestimmung von Nicotin im Blut	77
- Auswertung	79
5.3 Ergebnisse	84
6. Einfluß kontinuierlicher Nicotin- zufuhr auf die Nahrungs- und Flüssig- keitsaufnahme	88
6.1 Anorexigene Wirkung	89
6.2 Einfluß auf die Trinkwasseraufnahme	113
7. Toleranzentwicklung bei ständiger Nicotinzufuhr	120
- Enzyminduktion durch Nicotin?	123
- Nicotin-Toleranz	129
7.1 Die Nicotin-bedingte Hypothermie	133
7.2 Antinocizeptive Wirkung	142
8. Versuchsbedingungen bei den Tierexperimenten	152
9. Zusammenfassung	159
10. Literatur	162
11. Allgemeine Formelzeichen	187
12. Lebenslauf	190
13. Danksagung	191

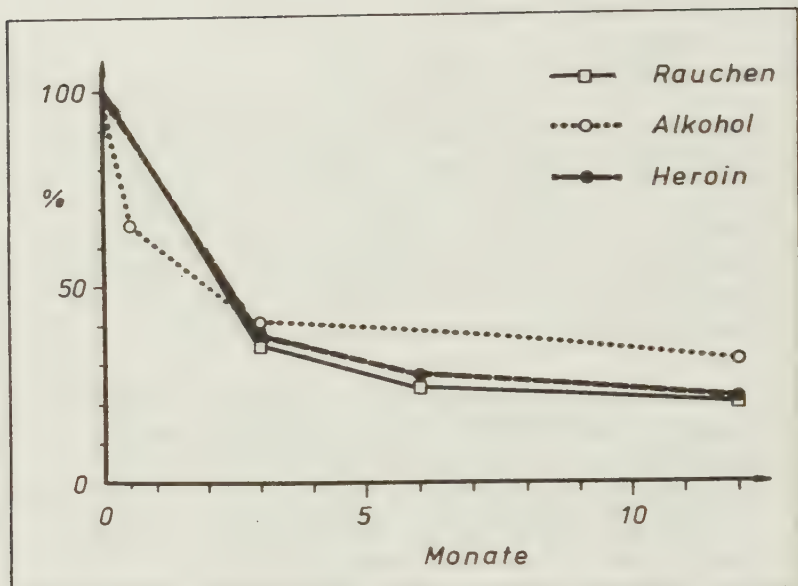
1. Einleitung

Um die Wirkungsweise des Nicotins, das den Gegenstand dieser Dissertation bildet, genauer zu verstehen, und um zu erfahren, welchen Zweck in diesem Zusammenhang die kontinuierliche Applikation im Tierversuch hat, soll hier zunächst auf die Bedeutung dieses Alkaloides im Tabakrauch eingegangen werden und auf seine vielfältigen Wirkungen im Organismus.

Nicotin - das Hauptalkaloid der Tabakpflanze (*Nicotiana tabacum* und *N. rustica*) - wird in größeren Mengen produziert als jedes andere Alkaloid. 1979 wurden in der Bundesrepublik 156 273 Millionen Stück Zigaretten hergestellt (Statistisches Bundesamt 1980). Das entspricht etwa 1 000 t des reinen Alkaloides.

Die rauchenden Bundesbürger lassen im Jahr 19 384 Millionen DM (!) (Deutsche Hauptstelle gegen die Suchtgefahren 1980) in "blauen Dunst" aufgehen, eine Summe, gegen die sich zum Beispiel die jährlichen Gesamtausgaben der gesetzlichen Krankenversicherung für Arzneimittel mit 11 379 Millionen DM (Bundesverband der pharmazeutischen Industrie 1980) vergleichsweise gering ausnehmen (Zahlen für das Jahr 1979).

Der ständig steigende Zigarettenkonsum bedroht Leben und Gesundheit vieler, vor allem auch junger Menschen. Inhalierendes Rauchen ist die Hauptursache von Lungenkrebs und ist bei der Entstehung kardiovaskulärer Krankheiten und chronischer Atemwegserkrankungen in



Prozentsatz abstinenter Ex-Konsumenten in Abhängigkeit von der seit dem Entzug vergangenen Zeit. Graphik nach Gritz u. Jarvik (1978), umgezeichnet.

hohem Maße beteiligt. Diese durch Tabakrauch verursachten Schäden sind kaum dem Nicotin, sondern vorrangig den (prä-)cancerogenen polycyclischen Kohlenwasserstoffen, Nitrosaminen und anderen Bestandteilen anzulasten (Schmidt 1979). Mahnende Aufklärungsaktionen und die hohe (oder noch zu geringe?) Tabaksteuer waren bisher bei der Eindämmung der bedrohlich ansteigenden Zahl verrauchter Zigaretten erfolglos.

Fast jedem Raucher ist heute die Gefährlichkeit seines Tuns bekannt. Warum raucht er dann weiter?

Nur eine starke psychische Abhängigkeit kann dieses Verhalten erklären. Tatsächlich steht das Zigarettenrauchen im Hinblick auf die Rückfallquote bekannten "Suchtgiften" wie Heroin und Alkohol nicht nach, wie die Graphik zeigt.

Nicotin ist mit großer Wahrscheinlichkeit der für das abhängigmachende Potential des Tabakrauchs entscheidende Bestandteil (Kozlowski 1980). Damit ist dieses Alkaloid indirekt auch für die durch andere Tabakrauchbestandteile verursachten gesundheitlichen Schäden verantwortlich, die das Rauchen zum volksgesundheitlichen Problem Nr.1 machen (Surgeon General 1979). Das Wissen um die Wirkungsweise des Nicotins stellt den Schlüssel zum wissenschaftlichen Verständnis dieser Abhängigkeit dar und schafft hoffentlich die Grundlage für eine ursächliche Bekämpfung des Zigarettenrauchens mit seinen verheerenden Folgen.

Das von den damaligen Heidelberger Studenten Karl Ludwig Reimann und Wilhelm Heinrich Posselt 1828 zuerst in reiner Form dargestellte Alkaloid Nicotin (Koenig 1940) ist eine farblose, stark basisch reagierende Flüssigkeit. Mit Wasserdampf ist die Substanz leicht flüchtig (Siedepunkt 247 °C); der Geruch erinnert an den des Tabaks. Nicotin ist in praktisch allen - lipophilen wie hydrophilen - Lösungsmitteln unbeschränkt löslich.

Beide Stickstoffatome des Moleküls mit der genauen chemischen Bezeichnung 3-(1-Methyl-,2-pyrrolidinyl)-pyridin (Molekulargewicht 162,23) können in saurer Lösung protoniert werden; entscheidend für die

Resorbierbarkeit im Organismus ist hingegen der in neutraler und alkalischer Lösung stets vorhandene Anteil freier Base, die als kleines, ungeladenes Molekül Biomembranen schnell passieren kann. Der raschen Aufnahme des Alkaloids, vor allem über die Lungenalveolen, entspricht die schnelle Umverteilung mit anschließender, langsamerer Elimination und Exkretion. Obwohl die biologische Halbwertszeit beim Menschen immerhin mehr als eine Stunde beträgt (Rosenberg et al. 1980), fällt nach Inhalation eines Zigarettenrauchzuges der Nicotinspiegel im Hirn infolge der Umverteilung rasch wieder ab.

Nicotin wird sehr leicht von der Mundschleimhaut und vom Dünndarm, ja sogar von der unverletzten Haut aufgenommen, so daß es mit der geringen letalen Dosis von 50 mg (zwei Tropfen) für den Menschen auch zu einem ernstzunehmenden Gift wird. Neben seiner langen Geschichte als gewerbliches Gift bei der Tabakverarbeitung (Ramazzini 1718; Gehlbach et al. 1974) und Schädlingsbekämpfung hat es auch eine gewisse Bedeutung als Mordgift erlangt - und das nicht nur in der Phantasie von Kriminalschriftstellern (Agatha Christie). In einer Kurzgeschichte von Dorothy L. Sayers (1978) wurde sogar ein präparierter Korkenzieher, sozusagen als "Nicotinabgabesystem" zur unbeobachteten Applikation in den Portwein Seiner Lordschaft benutzt...

Grusz-Harday (1967) berichtet über 75 - tatsächliche - Selbstmordfälle in Ungarn.

Der Raucher zieht es jedoch vor, Nicotin häufig und in kleinen Dosen zu sich zu nehmen, und hierzu ist die Lunge der geeignete Applikationsort. Nach der Inhalation eines Zigarettenrauchzuges mit etwa 100 µg Nicotin steigt der Nicotingehalt im arteriellen Blutplasma jedesmal vorübergehend steil an, denn das inhalierte Nicotin wird ebenso schnell resorbiert

wie ein Narkosegas; die Retentionsrate beträgt bis zu 90% der eingeatmeten Menge (Armitage et al. 1975). Da die Resorption noch schneller vonstatten geht als die nachfolgende Umverteilung in die Gewebe, erzeugt das inhalierende Zigarettenrauchen zackenförmige Nicotinschübe im arteriellen Blut (Bättig 1980). Die Änderungen der Nicotinkonzentration erzeugen entsprechende Schübe auch in den gut durchbluteten cerebralen Geweben, da die Blut-Hirn-Schranke keine besondere Barriere für Nicotin bildet.

Auf diesem Wege nimmt das Alkaloid Einfluß auf das emotionale Gefüge des Menschen und von hier aus wird auch wohl das sogenannte "self-titrating behaviour" kontrolliert, das heißt der Raucher versucht, "seinen" Nicotinspiegel durch entsprechende Beeinflussung des Rauchverhaltens aufrecht zu erhalten (Jaffe 1980).

Um dieses Verhalten auf ungefährliche Art zu ermöglichen, wurde kürzlich ein handliches Gerät gefordert, das Nicotin wie eine Zigarette, aber ohne schädliche Begleitstoffe, zur Inhalation verfügbar macht (Friden 1979).

Seit den klassischen Experimenten von Langley u. Dickinson (1889) gilt Nicotin als der Prototyp einer ganglionär wirksamen Substanz. Weithin bekannt ist auch, daß Nicotin die vegetativen Ganglien zunächst stimuliert, dann aber aufgrund der Dauer-Depolarisation einen Block verursacht. Einen Überblick über die vielfältigen Wirkungen des Nicotins gibt die vorausgegangene Veröffentlichung von Opitz u. Horstmann (1981).

Wenn Nicotin die Ursache für das abhängige Rauchen ist, sollte es - ähnlich wie Morphin - auch im Tierversuch Abhängigkeit hervorrufen. Solche Versuche scheiterten bisher. Auch die Auslösung von Toleranz bereitet offenbar zumindest gegenüber einigen Wirkqualitäten Schwierigkeiten.

Es erschien aus diesen Gründen lohnend, einen Weg zu finden, Nicotin wochenlang in gleichbleibender Konzentration in allen Geweben des Versuchstieres präsent zu halten. Larson et al. (1961) regten bereits an, eine Nicotin-Toleranz durch ununterbrochene oder sehr häufige Zufuhr auszulösen, und sei es auch nur, um negative Ergebnisse zu zeitigen.

Somit ergab sich das Ziel dieser Dissertation: eine Methode zur kontinuierlichen Applikation von Nicotin bei kleinen Versuchstieren zu entwickeln und diese Möglichkeit dann - zum Beispiel zur schnellen Auslösung einer Toleranz - tierexperimentell zu nutzen. Die antinocizeptive Wirkung und die nicotinbedingte Hypothermie sind Wirkqualitäten, die eine bequeme Verfolgung der Toleranzentwicklung gestatten. Die willkommene Gelegenheit, unter diesen Bedingungen auch Auswirkungen auf Körpergewicht, Futter- und Wasseraufnahme zu untersuchen, sollte ebenfalls wahrgenommen werden; schließlich ist die Gewichtsreduktion eine weithin bekannte - und oft erwünschte - "Nebenwirkung" des Zigarettenrauchens.

Über die Bearbeitung dieses Themenkreises hinaus sollte dieser experimentelle Beitrag auch eine instrumentelle und gedankliche Hilfe für Versuche sein, mehr über die Problematik des abhängigen Rauchens zu erfahren.

2. Kontinuierlich freigebende Abgabesysteme (drug delivery systems)

2.1 Pharmakokinetische Bedeutung eines Abgabesystems nullter Ordnung für Nicotin

Das pharmakokinetische Verhalten von Nicotin sei anhand eines Zwei-Kompartiment-Modells zusammengefaßt. Ein solches Modell teilt den Organismus vereinfachend in Verteilungsräume ein und reduziert Aufnahme, Verteilung und Elimination eines Stoffes auf Austauschvorgänge zwischen diesen Kompartimenten untereinander und mit der Umwelt.

Da nicht mehr Kompartimente zur Berechnung herangezogen werden sollen, als zur hinreichenden Beschreibung der Vorgänge notwendig sind (Dost 1968) reicht für Nicotin das Zwei-Kompartiment-Modell aus. Es ist in Abbildung 1 dargestellt. Das zentrale Kompartiment B umfaßt hier die

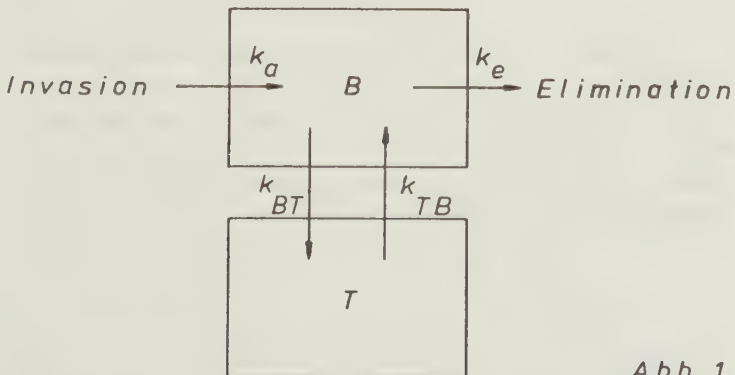


Abb. 1

Körperflüssigkeiten (vor allem das Blutplasma), T als "tieferes" Kompartiment die übrigen, vom Blutfluß schlechter erreichbaren Gewebe des Körpers, vor allem auch das Nervensystem als "Zielorgan" des Nicotins.

Transportvorgänge sind in dieser Darstellung durch Pfeile symbolisiert. Die über den Pfeilen angegebenen Konstanten bestimmen - in der Regel durch ihre Rolle als Bestandteil einer Exponentialfunktion - die Geschwindigkeit des jeweiligen Vorgangs:

$$(1) \quad C = C_0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad ^{\circ})$$

Vorgänge dieser Art heißen Kinetiken erster Ordnung, da ihre Geschwindigkeit der Konzentration des Stoffes proportional ist.

Eine Kinetik nullter Ordnung dagegen ist konzentrationsunabhängig. Sie ist in der Pharmakokinetik relativ selten (z.B. Alkoholabbau beim Menschen). Mathematisch wird sie durch Gleichung 2 beschrieben:

$$(2) \quad C = C_0 - k^0 \cdot t$$

Für jede Konstante einer Kinetik erster Ordnung gibt es einen festen Zeitraum $t_{(1/2)}$, in dem die Konzentration des Stoffes auf jeweils die Hälfte des Ausgangswertes absinkt. Für die Elimination eines Stoffes aus dem Blutplasma entsprechend Gleichung 1 ergibt sich diese sogenannte biologische Halbwertszeit wie folgt:

$$(3) \quad t_{(1/2)} = \frac{\ln 2}{k_e} \quad (\text{Dost 1949})$$

^o): Eine Erklärung der Formelzeichen findet sich in Abschnitt 11 (Seite 187 ff.).

Im Falle des Nicotins beginnt unmittelbar nach Injektion eines Quantums in das Kompartiment B (intravenöse Zufuhr) einerseits die schnelle Verteilung von B nach T, und andererseits die endgültige Elimination durch Metabolismus und Ausscheidung. Faßt man den ersten Vorgang mit der Verteilungskonstanten α und den zweiten mit der endgültigen Eliminationskonstanten β zusammen, erfolgt die Berechnung der Nicotinkonzentration im Blutplasma dann durch die Gleichung 4:

$$(4) \quad b = C_1 \cdot e^{-\alpha \cdot t} + C_2 \cdot e^{-\beta \cdot t} \quad (\text{Riegelman et al. 1968})$$

Das folgende Bild - Abb.2 a) und b) - zeigt in linearer und halblogarithmischer Darstellung die Kurve dieser Gleichung, berechnet für die intravenöse Zufuhr von 1 mg/kg Nicotin mit nach Miller et al. (1977) für die Ratte in abgerundeter Form eingesetzten Parametern. Wie aber stellt sich die Situation dar, wenn die Zufuhr in das zentrale Kompartiment B nicht auf einmal, sondern kontinuierlich in einer Kinetik nullter Ordnung erfolgt?

Da die Umverteilungs- und Eliminationsgeschwindigkeiten konzentrationsabhängig ansteigen, baut sich nach geraumer Zeit ein Fließgleichgewicht - der sogenannte "steady state" - auf, in dem die Eliminationsgeschwindigkeit der Zufuhrgeschwindigkeit betragsmäßig gleich wird, und die Konzentrationen in B und T konstant werden. Zur Betrachtung dieses Falles setzt man - ebenfalls für Nicotin bei der Ratte - realistische Werte ein und erhält nach der von Gillette (1974) angegebenen Gleichung 5 die Kurve in Abbildung 2 c).

Auch diese soll nur zur Illustration der bei den späteren Experimenten zu erwartenden Konzentrationen dienen und nicht die an anderer Stelle zu erörternden Meßergebnisse vorwegnehmen.

$$(5) \quad b = \frac{k_a^0}{\alpha \cdot \beta \cdot V} \cdot \left(k_{TB} - \beta \cdot \frac{\alpha - k_{TB}}{\alpha - \beta} \cdot e^{-\alpha \cdot t} - \alpha \cdot \frac{k_{TB} - \beta}{\alpha - \beta} \cdot e^{-\beta \cdot t} \right)$$

Der angestrebte, gleichmäßig hohe Wirkstoffspiegel sollte sich - in der Theorie - also auf die gezeigte Art erreichen lassen. Allerdings werden die langfristig keineswegs konstanten Einflußgrößen in Gleichung 5 schon von tageszeitlichen Schwankungen und erst recht von experimentell bedingten Störungen beeinflusst. Das entscheidende Problem ist jedoch die praktische Durchführung einer solchen Dauerzufuhr mit k_a^0 . Eine Dauerinfusion jedenfalls scheidet schon wegen der erheblichen Belästigung der Versuchstiere, die eine solche Behandlung über längere Zeit mit sich bringt, aus.

Der Weg in das zentrale Kompartiment B verläuft auch nicht zwingend intravenös, sondern kann zum Beispiel beim Nicotin ebenso gut auch über eine konstante Zufuhr in das subcutane Gewebe erfolgen. Nicotin passiert ja als vergleichsweise kleines Molekül mit ausgeprägt lipophilen Eigenschaften, aber dennoch vollständiger Wasserlöslichkeit Biomembranen leicht und schnell. So wurde nach subcutaner Applikation eine Absorptionshalbwertszeit von nur etwa zwei Minuten gefunden (Brady et al. 1979, beim Kaninchen). Mithin ist aus einem subcutan gelegenen Abgabekörper eine rasche Aufnahme des Nicotins zu erwarten. Unter diesen Annahmen sollte Gleichung 5 näherungsweise auch für die konstante subcutane Zufuhr anwendbar sein. Bei großen t vereinfacht sich diese komplizierte Formel ohnehin nach Gillette (1974) zu:

$$(6) \quad b_{ss} = \frac{k_a^0}{V \cdot k_e}$$

Eine Wartezeit von vier Halbwertszeiten nach Beginn der Zufuhr führt bereits zu einer Konzentration b von etwa 94% des b_{ss} (Gladtko u. von Hattingberg 1973), womit das Fließgleichgewicht schon nahezu erreicht ist.

Biopharmazeutische Abgabesysteme haben ihre eigene Kinetik, auf die im folgenden eingegangen wird.

Abbildung 2:

Abklingkurve nach intravenöser Zufuhr (a) und b))

von 1 mg/kg Nicotin bei der Ratte, berechnet nach Gleichung 4,
a) in einem linearen Koordinatennetz,
b) in semilogarithmischer Darstellung.

Parameter nach Miller et al. (1977), abgerundet:

$$\begin{array}{ll} C_1 = 0,13 \mu\text{g/ml} & \alpha = 3,0 \text{ h}^{-1} \\ C_2 = 0,07 \mu\text{g/ml} & \beta = 0,8 \text{ h}^{-1} \end{array}$$

Gerade A in b) entspricht dem Umverteilungsvorgang,
Gerade B der Elimination.

c) Erreichen des "steady state" bei Dauerinfusion

Die Kurve wurde nach Gleichung 5 berechnet.

Auch hier wurden Zahlenwerte nach Miller et al. (1977) eingesetzt:

$$\begin{array}{ll} V = 2000 \text{ ml/kg} & \alpha = 3,0 \text{ h}^{-1} \\ k_a^\circ = 500 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1} & \beta = 0,8 \text{ h}^{-1} \\ k_{TB} = 1,9 \text{ h}^{-1} & \end{array}$$

Die Infusionsrate k_a° wurde in dieser Höhe angenommen, da die Größenordnung den späteren Experimenten entspricht.

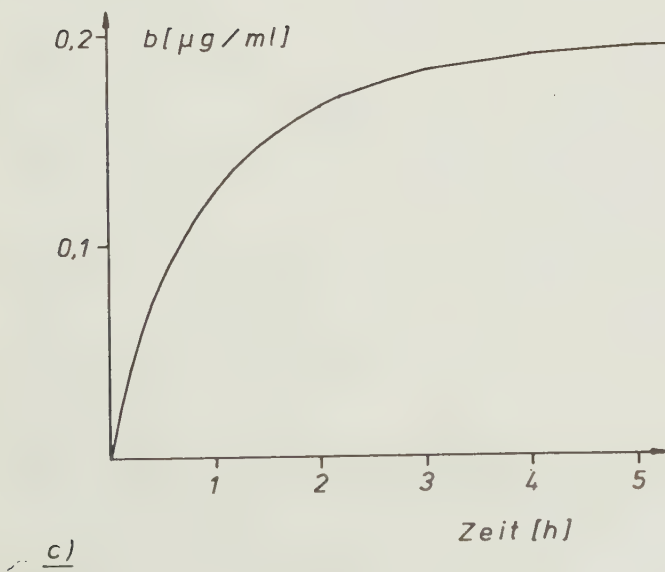
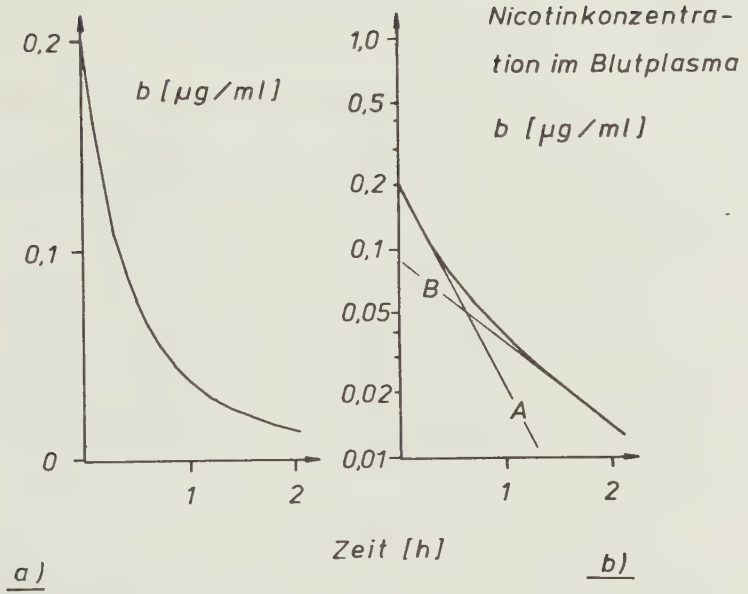


Abb. 2

2.2 Möglichkeiten für die Konzeption von Abgabesystemen

"Drug delivery systems" - für diesen englischsprachigen Begriff, der in etwa synonym mit "slow release devices" und "therapeutic systems" gebraucht wird, gibt es in der deutschen Sprache keinen gleichwertigen Ausdruck; vielfach spricht man nicht sehr treffend von "therapeutischen Systemen". Das Konzept solcher Systeme ist trotz unterschiedlicher Bauart und Zweckbestimmung gleich: Der pharmakologisch aktive Stoff wird aus einem Reservoir mit Hilfe einer Energiequelle (eines osmotischen Druckgradienten zum Beispiel) über eine Kontrolleinheit für eine Zeitlang gleichmäßig abgegeben.

Als Produzent kommerziell erhältlicher "therapeutischer Systeme" hat die Firma ALZA in Palo Alto (CA) in den USA eine besondere Vielfalt solcher Applikationssysteme entwickelt (Shaw 1980). Von diesen ist zum Beispiel das OROS^R, ein oral zugeführtes, tablettenähnliches System, oder das TTS^R (Transdermales Therapeutisches System) zu erwähnen, das Scopolamin, lokal appliziert, kontinuierlich zur systemischen Wirkung bringt. Für lokale Zwecke am Auge (Glaukombehandlung) hat sich das Ocusert^R-System bereits praktisch bewährt - es gibt durch eine kontrollierende Membran stündlich 20 bzw. 40 µg Pilocarpin ab (sieben Tage lang) - und das Progestasert^R, ein intra-uteriner Progesteron-Applikator, bleibt als lokales Kontrazeptivum in utero sogar ein Jahr lang wirksam.

Für die Zwecke der pharmakologischen Forschung hat die Firma ALZA die alzet^R-minipump entwickelt. Mit dieser ist ein System verfügbar, das bequem (etwa in Ratten) implantiert werden kann, wahlweise für sieben oder vierzehn Tage hinreichend konstante Stoffzufuhr garantiert und vor allem für die Anwendung verschiedener

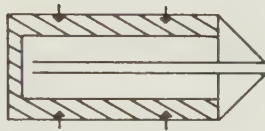


Abb. 3

Stoffe geeignet ist, deren Lösung der Experimentator vor Versuchsbeginn selbst einfüllt. Da auch dieses Gerät Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen ist, soll seine Wirkungsweise kurz erläutert werden. Als energielieferndes Prinzip wird der osmotische Druck zwischen Lösungen verschieden hoher Konzentration eingesetzt. Durch die mechanisch einigermaßen stabile Außenhaut diffundiert (Gewebs-) Wasser kontrolliert in den schraffierten Bereich in Abbildung 3 und führt durch Kompression sukzessive zu einem Ausstrom der Pharmakonlösung aus dem im Innern befindlichen, verformbaren Kunststoffbehälter.

Da dieser von vielen, besonders lipophilen, Lösungsmitteln und Arzneistoffen angegriffen werden kann, ist das Anwendungsfeld der "minipump" trotz des vielseitigen Konzepts immer noch begrenzt. Die Verwendbarkeit hängt davon ab, ob die zu applizierende Substanz genügend stark wirksam und in den kompatiblen Lösungsmitteln ausreichend löslich ist. Wie weiter unten gezeigt wird, ist insbesondere die Verwendung von reiner Nicotinbase infolge Inkompatibilität nicht möglich.

Neben der Benutzung dieser osmotischen Kleinstpumpe hat es nicht an Versuchen der Anwender selbst gefehlt, für ihren Zweck und für ihre Versuchssubstanz geeignete Abgabesysteme zu entwickeln. So sind zum Beispiel

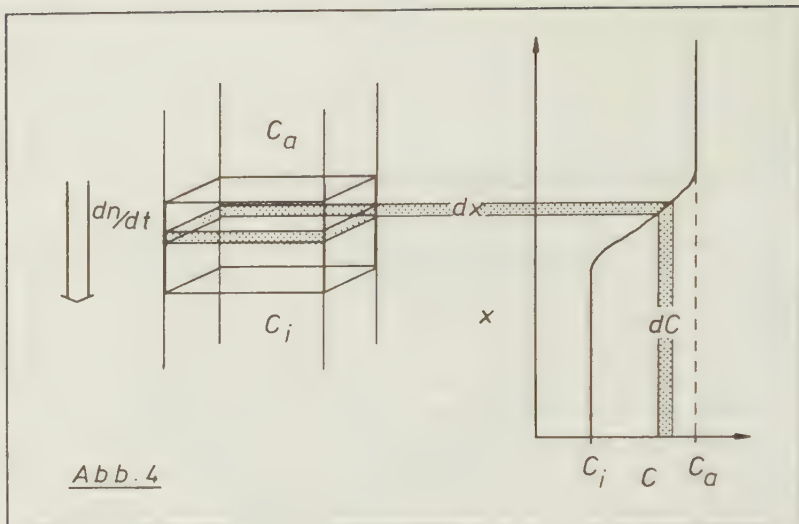


Abb. 4

Abbildung 4: Bildliche Darstellung des Diffusionsvorgangs nach dem ersten Fickschen Gesetz. Symbole sind auf Seite 187 ff. erklärt.

Implantationstabletten (sogenannte Pellets) unentbehrlich für die rasche Erzeugung einer Morphin-Toleranz (siehe zum Beispiel Reimann 1977).

Mit Hilfe von Siliconkautschuk wurden Pestizide, Steroide und viele andere Stoffe in "slow release devices" appliziert. Dies soll Anlaß sein, kurz auf das Grundprinzip der meisten dieser Abgabesysteme einzugehen, nämlich auf den Diffusionsvorgang durch Polymere.

Diffusion beruht auf der Brownschen Molekularbewegung und führt durch Ausgleich eines Konzentrations-Gefälles zum Stofftransport. Für die Beschreibung dieses Vorgangs stellte A. Fick im Jahre 1855 das nach ihm benannte erste Diffusionsgesetz auf:

$$(7) \quad \frac{dn}{dt} = - D \cdot Q \cdot \left(\frac{dC}{dx} \right) \quad (\text{siehe Abb. 4})$$

Abbildung 5:

Diffusionsverhalten in drei verschiedenen Typen von Abgabesystemen

- a) Zustand vor Beginn,
- b) nach geraumer Zeit,
- c) kurz vor Beendigung der Abgabe.

Ordinaten: C - Konzentration des Wirkstoffs im System selbst und in seiner unmittelbaren Umgebung.

Abszissen: x - Wegstrecke in einer Querachse des Systems.

Die neun Einzelzeichnungen zeigen jeweils im oberen Teil einen Querschnitt des Abgabesystems und unten ein Diagramm des Konzentrationsverlaufs im Gerät. Während der Konzentrationsverlauf in den beiden oberen Reihen ohne exakte Berechnung skizziert wurde, geschah dies in der untersten Reihe (Typ 3) mit Hilfe der folgenden Gleichung 8:

$$(8) \quad C_{ss} = \frac{(C_i - C_a) \cdot \ln R}{\ln R_i - \ln R_a} + \frac{(C_a \cdot \ln R_i - C_i \cdot \ln R_a)}{\ln R_i - \ln R_a}$$

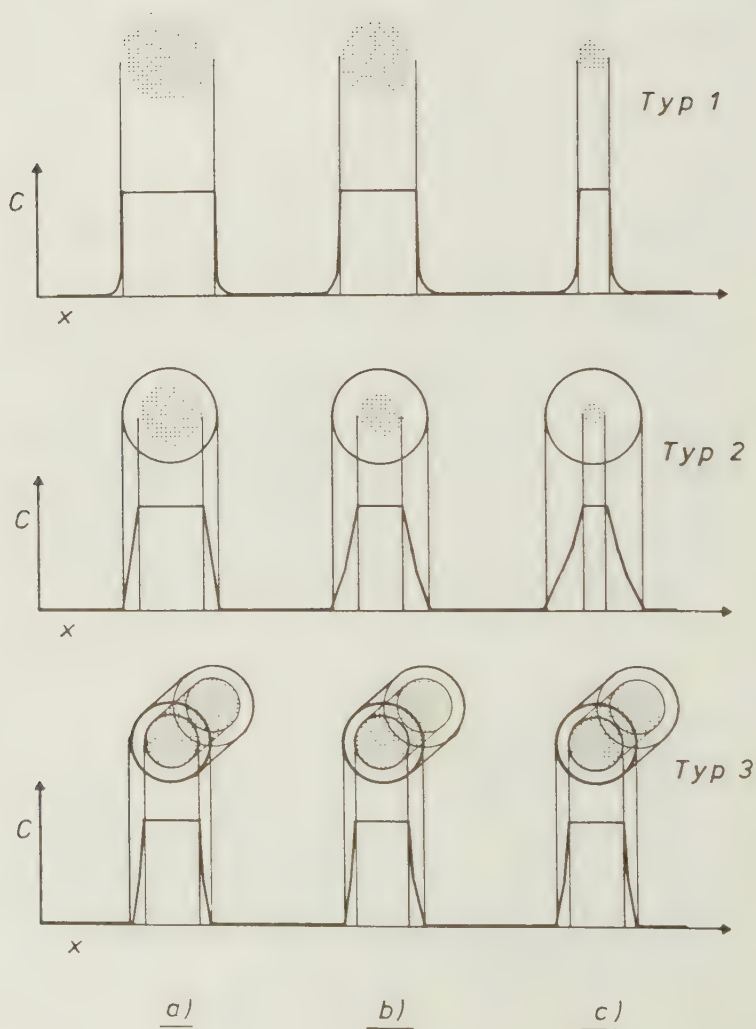
(Barrer 1951)

Eingesetzt wurde:

Innenkonzentration	$C_i = 1,$
Außenkonzentration	$C_a = 0,$
Innenradius	$R_i = 4 \text{ mm}$ (maßstabgerecht),
Außenradius	$R_a = 20 \text{ mm}$ (maßstabgerecht).

Die Konzentrationen sind als dimensionslose Zahlen zwischen 1 und 0 berechnet und aufgetragen, die Radien entsprechen dem Maßstab der Zeichnung.

Abb. 5



Ein Abgabesystem mit einer Kinetik nullter Ordnung (Abgabegeschwindigkeit unabhängig von der Zeit) muß ein konstantes dn/dt besitzen. Um das zu erreichen, sollten die drei in Gleichung 7 angegebenen Einflußparameter ebenfalls konstant sein. Dieser Forderung kommen in der Literatur beschriebene Geräte in unterschiedlichem Grade nach.

In Abb.5 sind drei häufige Grundtypen implantierbarer Abgabesysteme einander gegenübergestellt, die nun besprochen werden.

- Typ 1

Das einfachste denkbare System besteht nur aus der bei Körpertemperatur festen Reinsubstanz, die in Kristallform (z.B. bei Depotinjektion als Kristallsuspension) oder als (in Abb.5 kugelig dargestelltes) Komprimat ins Gewebe verbracht wird. Ähnlich verhalten sich auch solche Preßlinge, die aufgrund der Erodierbarkeit der verwandten Hilfsstoffe mit gleichmäßiger Geschwindigkeit von außen her gelöst werden. Die Stoffabgabegeschwindigkeit ist hier durch die Lösungsgeschwindigkeit an der Oberfläche begrenzt; anschließend erfolgt dann leicht die Diffusion durch das Gewebe in den Blutraum (in der Abbildung mit einer angedeuteten Anstiegsflanke gezeichnet).

Ballard u. Nelson (1962), die sich um die theoretische Beschreibung der Auflösung implantierter Feststoffe bemühten, setzten voraus, daß, beispielsweise beim kugelförmigen Preßling, der Durchmesser wegen der konstanten Auflösungsgeschwindigkeit mit der Zeit gleichmäßig kleiner wird:

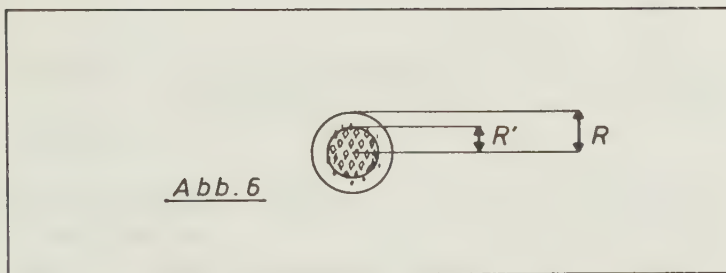
$$(9) \quad dD_k/dt = -k$$

Das bedeutet: Die Stoffabgabe verläuft pro Oberflächeneinheit zeitlinear. Da die Oberfläche aber durch den Volumenverlust schrumpft, fällt die Abgaberate des Systems mit der Zeit ab. Ballard u. Nelson entwickelten die folgende Gleichung aus der Oberflächenformel für die Kugel:

$$(10) \quad M = (\pi \cdot \rho / 6) \cdot (D_{OK} - k \cdot t)^3$$

Die beiden Autoren führten entsprechende Gleichungen auch für andere geometrische Körper an und fanden, daß kugelförmige Komprimata bei vorgegebenem Gewicht zwar die längste Lebensdauer aufweisen, sich in der Charakteristik der Stoffabgabe aber am wenigsten zeitlinear verhalten.

- Typ 2 stellt bereits ein Zwei-Phasen-System dar: Der Wirkstoff liegt in einer massiven Polymerkugel dispergiert vor und sättigt das Polymer durch Diffusion, indem er aus dem festen Zustand heraus in Lösung geht. An der Oberfläche der Polymerkugel wird das Pharmakon über den Kontakt mit durchblutetem Gewebe an den Organismus abgegeben. Dies führt nach und nach zu einer Verarmung der äußeren Kugelschalen durch schnellere Auflösung der Wirkstoffteilchen dicht unter der Außenfläche. Higuchi (1963), der für dieses Modellsystem angenäherte Abgaberraten auf theoretischem Wege ermittelte, vereinfachte das Problem durch die Annahme sogenannter "pseudo steady state"-Bedingungen. Damit ist das Vorhandensein eines Diffusionsgleichgewichts zwischen disperser (Wirkstoff-) und äußerer (Polymer-) Phase gemeint. Da der gesamte Abgabevorgang bei diesem Typ diffusionskontrolliert verläuft, unterteilt Higuchi die Kugel in eine Außenschale (Radius $r \geq R'$), in der die Diffusion in die Umgebung



stattfindet, und in eine innere Kugel mit $r < R'$, in der noch ausreichend viele dispergierte Wirkstoffteilchen vorhanden sind, um das Material zu sättigen. Da die Auflösung der Partikelphase immer weiter nach innen fortschreitet, wird R' - zunächst dem Gesamtradius R gleich - immer kleiner, wie in Abbildung 6 angedeutet ist.

Dies führt zu einer ständigen Verbreiterung der Diffusionszone und damit zu einer Verringerung der Abgaberate durch die Abnahme von dC/dx in Gleichung 7. Die auf dem ersten Fickschen Gesetz aufbauende Beziehung zwischen Zeit und verbleibendem Stoffanteil in der Kugel drückt Higuchi dann in einer implizit formulierten Gleichung aus:

$$(11) \quad 1 - 3 \cdot (R'/R)^2 + 2 \cdot (R'/R)^3 = B \cdot t$$

Da der Ausdruck $(R'/R)^3$ dem Anteil noch nicht freigegebener Substanz entspricht, kann Gleichung 11 zur Berechnung der idealisierten Zeit-Abgabe-Kurve verwandt werden (siehe Abb. 7). Die Werte hierzu wurden mit Hilfe eines kleinen Rechnerprogramms ermittelt. Es ist deutlich sichtbar, daß die Abgabekinetik eher einer Zeitabhängigkeit erster als nullter Ordnung entspricht. Nach Brooke u. Washkuhn (1977) kann bei planaren

und zylindrischen Formulierungen dieser Art auch keine Abgabe nullter Ordnung erreicht werden.

- Typ 3

Das dritte in Abbildung 5 aufgeführte System besteht aus einem Polymerhohlzylinder (Schlauch), der in seinem Innern den Wirkstoff gelöst oder als flüssigen Reinstoff (Nicotin) enthält. Sorgt man für gleichbleibende Konzentration im Innern und Konstanz der geometrischen Parameter - eine in der Praxis nur schwer lösbare Aufgabe - bleibt der Konzentrationsgradient im Schlauchmaterial stabil und damit über Gleichung 7 die Abgaberate konstant. Die Formel für die Wirkstoffabgabe eines solchen idealisierten Systems wird von Barrer (1951) angegeben:

$$(12) \quad M = 2 \cdot \pi \cdot D \cdot (C_a - C_i) \cdot t \cdot (\ln R_a - \ln R_i)^{-1}$$

Auf Einzelheiten wird weiter unten bei der Vorstellung von Ausführungsbeispielen dieses Typs eingegangen.

Die Anzahl der veröffentlichten "drug delivery systems", die von den Autoren jeweils für eine bestimmte Substanz hergestellt und in vivo eingesetzt wurden, ist mittlerweile beträchtlich. Einen fundierten Überblick über den Stand der Entwicklungen auf diesem Gebiet gibt Robinson (1978). Dennoch sollen hier einige Beispiele angeführt werden, die eine Vorstellung von den Möglichkeiten bei der kontrollierten Abgabe einiger Stoffe geben sollen.

Komprimat einer Verreibung von Natriumcyclamat mit der vierfachen Menge Cholesterin benutzten Bryan u. Ertürk (1970), um nach Implantation in die Harnblase von Mäusen Blasentumoren zu induzieren. Die Abgabegeschwindigkeit

Abbildung 7:

Rechnerisch ermittelte Stoffabgabe der drei beschriebenen Typen von Abgabesystemen

- a) lineares Koordinatennetz
- b) semilogarithmische Darstellung

Ordinate: Im Abgabesystem verbliebene Stoffmenge M ; M_0 ist dabei auf jeweils 100 mg normiert,

Abszisse: Zeit t in Stunden, wobei das Ende der Abgabe auf 100 Stunden festgelegt wurde.

Die Berechnung der Kurven erfolgte bei Typ 1 nach Gleichung 10. Bei Typ 2 wurden die Werte mit dem Tischrechner Hewlett-Packard 9825 A über ein Näherungsprogramm nach Gleichung 11 errechnet, und bei Typ 3 verwandte man als Vereinfachung von Gleichung 12 die lineare Gleichung 13:

$$(13) \quad M = M_0 - k \cdot t$$

Eine Kinetik nullter Ordnung liegt vor, wenn die Kurve in a) eine Gerade ist; einer Kinetik erster Ordnung entspricht dann eine Gerade in b). Nur Typ 3 läßt - nach der Theorie - eine zeitlineare Abgabe erwarten. Dahingegen zeigen die Typen 1 und 2 davon abweichende Kurvenverläufe, die insgesamt eher einer Kinetik erster Ordnung entsprechen.

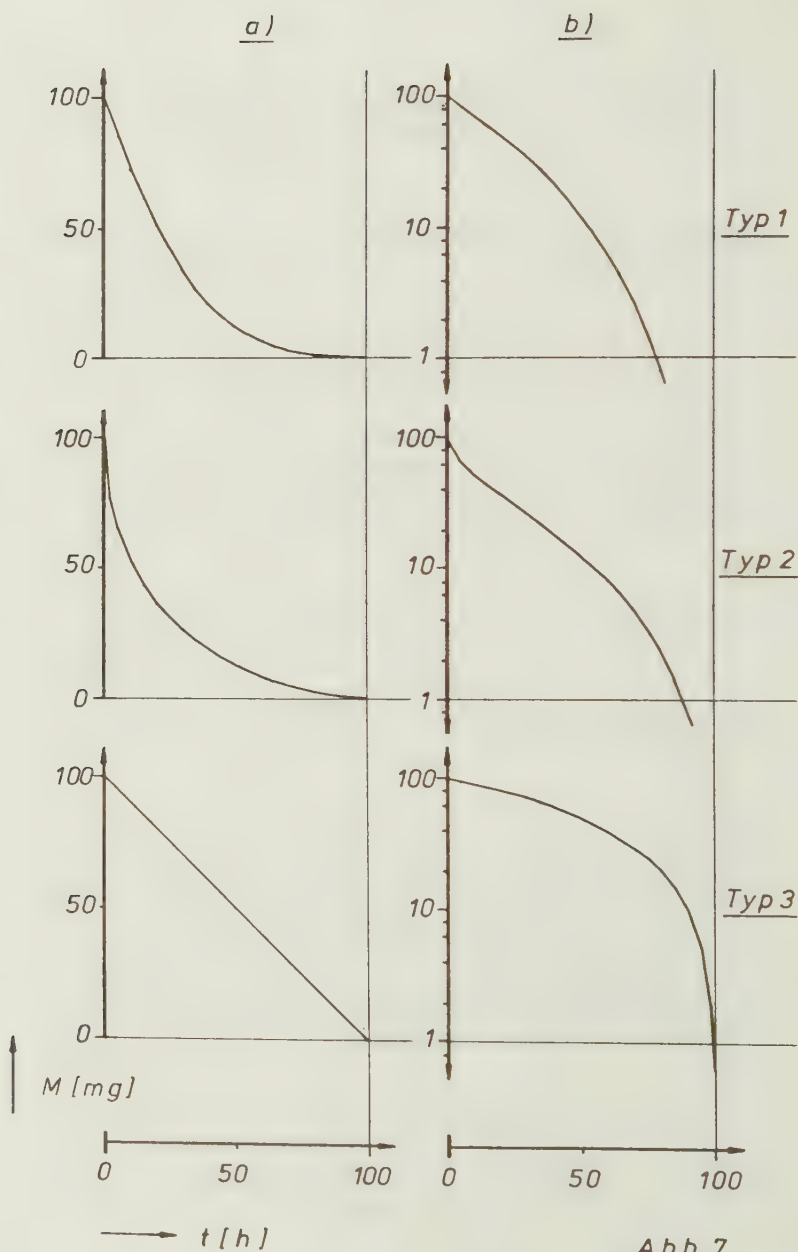


Abb. 7

entsprach einer Kinetik erster Ordnung mit einer Halbwertszeit von 1 h. Die Rezeptur eines Morphin-"Pellets" auf der Basis von mikrokristalliner Cellulose von Gibson u. Tingstad (1970) dient - wie bereits erwähnt - zur schnellen Auslösung von Toleranz bei kleinen Versuchstieren. Bläsigt et al. (1973) fanden bei diesem "Pellet" eine schnelle Abnahme der Morphin-Abgabegeschwindigkeit nach subcutaner Implantation bei der Ratte.

Die meisten Abgabesysteme auf der Basis einer festen Lösung oder einer Suspension in fester Polymergrundlage (Typ 2) zeigen in etwa eine lineare Abhängigkeit der Abgaberate von der Quadratwurzel der Zeit. Dies gilt auch für die von Allan et al. (1971) hergestellte feste Lösung des Chemosterilisans HMPT (hexamethylphosphoric triamide) in einer Polyamidmatrix als Beispiel aus der Schädlingsbekämpfungs-Technologie.

Lotz u. Syllwasschy (1979) benutzten eine Matrix aus Silikonkautschuk zur verzögerten Abgabe der sehr kurzlebigen Peptide LH-RH und TRH.

Ohne genaue Ergebnisse in vitro anzugeben, berichten Bass et al. (1965) über Atropin- und Histamin-Implantate, die sie entweder nach dem Prinzip der vorigen Autoren in Form einer Matrix oder aber als wirkstoffgefüllten Siliconschlauch hergestellt hatten.

Die letztgenannte Art der Applikation - sie entspricht im Grundgedanken Typ 3 - wurde von Dziuk u. Cook (1966) ebenfalls gewählt, als sie neben anderen Steroiden ein Gestagen (MGA: 17- α -acetoxy-6-methyl-16-methylen-pregna-4,6-dien-3,20-dion) in Silikonkapseln füllten und weiblichen Schafen subcutan implantierten. Die auf diese Weise behandelten Tiere zeigten eine verminderte Brunsthäufigkeit, die sich nach der Explantation wieder normalisierte.

Siliconschläuche und -folien, die im medizinischen Bereich viel gebraucht werden, lassen sich zum Beispiel unter Verwendung von selbst vulkanisierender Siliconmasse leicht zu implantierbaren Kapseln verarbeiten. Auf diese Weise sind außer Steroiden unter anderem Halothan (Edmunds u. Sachdev 1979) und andere Inhalationsnarkotika (Folkman et al. 1966), Ethanol (Erickson et al. 1980, Ellison et al. 1981) und auch Amphetamin (Huberman et al. 1977) verarbeitet worden.

Das Abgabesystem für Amphetamin besteht aus einem Siliconschlauch, dessen Abgabefläche durch hineingeschobene Schlauchstücke aus (schlechter durchlässigem) Polypropylen reduziert wurde. Nielsen u. Ellison (1980) verbesserten dieses Gerät dadurch, daß sie die Abgabefläche noch weiter verkleinerten und das Amphetamin in Mischung mit Siliconöl einfüllten. Auf diese Weise wurde eine geringere Abgabegeschwindigkeit und längere Lebensdauer der "Pellets" erreicht.

Auch über die kontinuierliche Abgabe von Nicotin liegen Veröffentlichungen vor, zum Beispiel die Arbeit von Stolerman et al. (1973). Hier wurde auf ein bereits erfolgreich bei der Applikation von Morphin bewährtes System (Goode 1971) zurückgegriffen. Die kontrollierende Membran in diesem Modell besteht allerdings im Gegensatz zu den anderen, bisher besprochenen, Systemen nicht aus einer vergleichsweise massiven Siliconschicht, sondern aus einer dünneren (mikroporös-semipermeablen) Cellophanmembran. Während das System subcutan in der Ratte implantiert ist, muß die eingefüllte Nicotintartratlösung alle

24 h ausgetauscht werden, da sie sich rasch erschöpft und dann die Abgabe nachläßt.

Gaginella et al. (1974) setzten, wie das auch in der vorliegenden Arbeit geschieht, lipophile Barrieren zur kontrollierten Abgabe dieses Alkaloides ein und verwandten dazu beidseitig verschlossene, nicotin-gefüllte Schläuche aus zwei verschiedenen Siliconmaterialien (Trifluorpropylmethylpolysiloxan und Dimethylpolysiloxan). Dabei erwies sich das fluoriierte Material im Tierversuch als das geeignetere (Gaginella u. Bass 1974), da es die angemessenere Abgaberate besaß. Für den theoretischen Betrachter ist es allerdings überraschend, daß die Autoren in vitro eine Abgabekinetik erster Ordnung feststellten. Hier wird deutlich, daß verschlossene Schläuche in der Praxis meist keine Freigabekinetik nullter Ordnung (Typ 3) aufweisen. Zwei mögliche Ursachen dafür sind hier vorgeschlagen:

Wenn der Schlauch sich eher starr verhält, nimmt der Mengenanteil der Flüssigkeit im Schlauch ständig ab und wird durch eine Luftblase ersetzt (siehe hierzu eigene Experimente in Abschnitt 4). So ist nach Abgabe von 50% der Menge auch nur noch eine auf 50% herabgeminderte Abgaberate zu erwarten, weil sich die Diffusionsfläche inzwischen auf die Hälfte verkleinert hat. Auf diese Weise könnte eine Freigabekinetik erster Ordnung resultieren.

Sofern - das ist die zweite mögliche Erklärung - das Schlauchmaterial aber weich bzw. dünnwandig

ist und dann, dem nachlassenden Innendruck folgend, kollabiert, wird die Dicke des Schlauches abnehmen und demzufolge auch eine Restriktion der Abgabefläche resultieren.

Die so erklärbare Abnahme der Freigaberate in den Systemen von Gaginella et al. (1974) ist aber nicht deren einzige nachteilige Eigenschaft. Selbst bei dem schwer permeablen Fluorsiliconschlauch ist die Abgaberate für längerdauernde Tierexperimente noch zu groß; nach zwei Tagen waren etwa 50% der in den Schlauch eingefüllten Menge bereits in die thermostatisierte Pufferlösung abgegeben!

Durch die Verkleinerung der Abgabefläche einerseits und durch ein starres Grundgerüst aus Glas andererseits lassen sich die geschilderten Nachteile eliminieren. Wie das geschieht, zeigt das folgende Kapitel.

3. Konzeption des Nicotinabgabesystems (NAS)

3.1 Beschreibung

Das ampullenförmige Reservoir aus Glas enthält 100 bis 300 µl flüssige Nicotinbase und läßt ein rundes, gebohrtes Loch als Aussparung frei. Diese Aussparung ist der Bereich, aus dem Nicotin durch das Siliconmaterial des umgebenden Schlauches nach außen diffundiert. Im Innenraum verbleibt dann eine mit der Zeit größer werdende Luftblase. Der Haken des Glasreservoirs ist gegenüber dem Loch um 90° in der Längsachse des Gerätes verdreht angebracht, wie Abbildung 8 zeigt. Dieser Haken dient übrigens später zur korrekten räumlichen Orientierung im Tierkörper, da das Loch ständig mit Nicotin benetzt bleiben sollte und deshalb nach unten ausgerichtet wird.

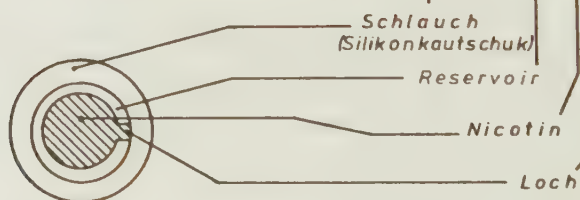
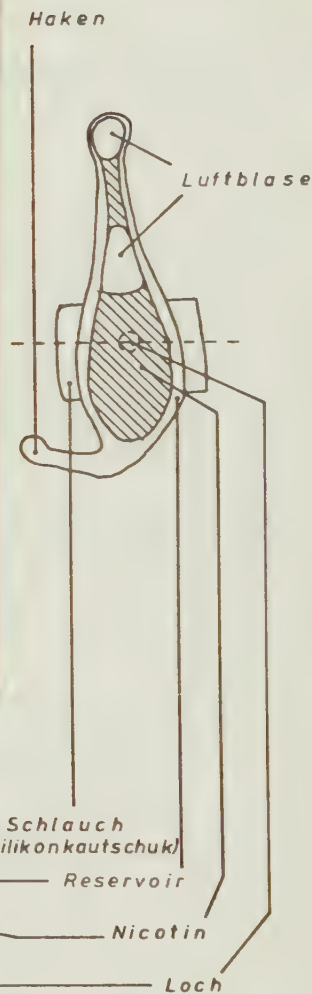
3.2 Herstellung

- Material: - Gasbrenner "Varaflame"^R (Ronson),
- Glaszylinderspritze 1 ml mit Recordansatz
und Recordkanüle Nr. 14,
- Siliconschlauch:
a) Grundmaterial Dimethylpolysiloxan: Raumedic^R
Rau-Sik 8363, Shore 60+5, Farbcode 20900,
Art.-Nr. 818 300; Durchmesser innen 3,2 mm, Wand-
stärke 1,6 mm (Rehau Plastiks AG, 8673 Rehau),

Abbildung 8 gibt a) eine Photographie des NAS sowie einen gezeichneten b) Längs- und c) Querschnitt des Gerätes wieder. Zur Orientierung (etwa dreifache Vergrößerung) ist ein Maßstab hinzugezeichnet.



a) Photographie



c) Querschnitt

Abb. 8

1 cm

b) Grundmaterial Trifluorpropylmethyldopolysiloxan:

- Raumedic Rau-Sik 8700, Farbcode 11902; Hersteller und Abmessungen wie bei a),*
- Nicotinbase reinst (Serva, Art.-Nr. 77635),
- n-Hexan reinst (Merck, Art.-Nr. 4368),
- Pasteurpipetten: Länge 150 mm, Durchmesser innen 5,5, außen 6,5 mm.

Zur Vorbereitung wird das Glasrohr etwa einen halben Zentimeter vor der Verjüngung unter ständigem Drehen erhitzt, bis Glasmaterial in genügender Menge angesammelt ist (Abb.9 a)). Nach Entfernen der Gasflamme kann nun der erweichte Bereich bis auf etwa drei Zentimeter ausgezogen werden. Das auf der gegenüberliegenden Seite des entstandenen Rotationsellipsoids gelegene Auslaufrohr der Pipette wird anschließend rechtwinklig abgeschmolzen, so daß ein rundlich-hakenförmiger Abschluß entsteht (Abb.9 b)). Dieses ampullenähnliche Gebilde wird abgesägt (Abb.9 c)) und soll nun noch ein gebohrtes Loch erhalten:

Abbildung 9:

Die Zeichnung zeigt die beschriebenen Arbeitsgänge der Herstellung eines NAS in folgenden Stadien:

- a) Ziehen des Füllröhrchens,
b) Ziehen des Verankerungshakens,
c) Ablösen vom Pipettenrohr,
d) Aufziehen des Schlauches (nach dem Bohren des Loches),
e) Füllvorgang.

Dabei bedeuten:

dicke Pfeile Hitzeeinwirkung,

Strichpfeile Zugrichtung,

"S" Schnittstelle des Glasmessers.

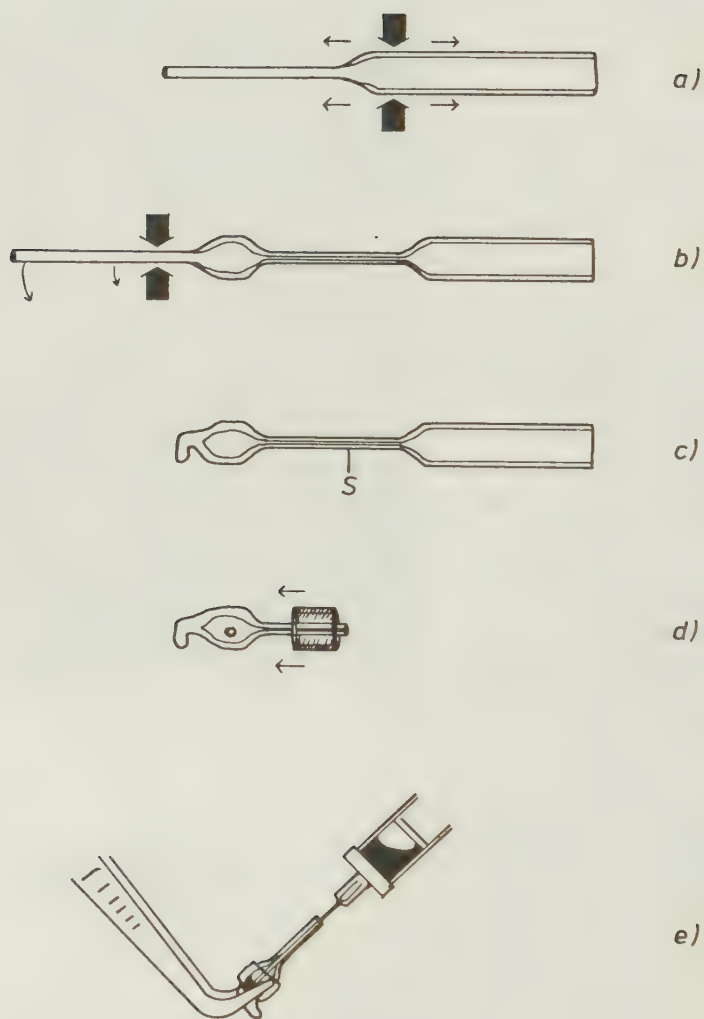


Abb.9

Dazu wird das Glasgerät an der äußersten Erhebung des "Bauches" angeköhrt und dort mit einem hochoberigen, turbinengetriebenen zahnärztlichen Diamantbohrer (Fa. Siemens) auf etwa 1 mm Durchmesser einseitig durchbohrt. Diese Arbeit übernahm dankenswerterweise Herr Dr.med.dent. G. Keschull. Für Vorversuche wurden größere Löcher auch durch Abblasen in einer heißen Gasflamme erhalten.

Die geometrisch richtige Lage des Loches ist aus der Abbildung ersichtlich. Legt man das Gerät in der Ausrichtung des Buchstaben "L" auf eine ebene Tischplatte, so muß die Lochöffnung nach unten weisen. Abschließend wird ein etwa 6 mm langes Siliconschlauchstück für eine halbe Minute in n-Hexan gelegt und dann sofort auf die bauchige Erweiterung des Glasreservoirs aufgezogen (Abb. 9 d)).

Der Füllvorgang muß wegen der hohen Toxizität und leicht möglichen Hautresorption des Nicotins unter besonderen Sicherheitsmaßnahmen erfolgen. Es empfiehlt sich:

- Schutzhandschuhe zu tragen (im Falle der Kontamination sofort abwaschen und ablegen!),
- zum Entfernen der beim Abschmelzen entstehenden Dämpfe einen gut ziehenden Abzug zu benutzen,
- die verwendeten Geräte sofort nach Gebrauch mit verdünnter Säure abzuspielen.

Zunächst werden etwa 0,4 ml Nicotin durch die Kanüle in die Glasspritze aufgezogen. Während nun die linke Hand das leere NAS (Öffnung nach schräg oben) mit Hilfe einer Pinzette fixiert, führt die rechte die Kanüle so weit wie möglich in die Glasampulle ein und füllt das Gerät in dieser Haltung bis auf ca. 80% des Fassungsvermögens mit dem flüssigen Nicotin auf (Abb.9 e)). Daraufhin wird die Einfüllöffnung mit der Gasflamme

verschmolzen.

Im allgemeinen wurde Schlauchmaterial a) verwandt, sofern im folgenden Text keine besonderen Anmerkungen gemacht werden.

3.3 Funktionsweise

Der Funktion nach ist das NAS ein Vertreter des unter 2.2 dargestellten Typs 3. Das funktionelle Kernstück ist der Überzug aus Siliconschlauch über der Aussparung im Glasampullenkörper. In Abb. 10 ist dieser Bereich deutlicher herausgezeichnet.

Zunächst löst sich der Inhalt des NAS, die flüssige Nicotinbase, aufgrund eines Verteilungsprozesses (ähnlich wie bei der Ausschüttelung zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Flüssigkeiten) in gleichbleibender Konzentration in der Innenseite des Schlauches. Da die Löslichkeit im Siliconmaterial bei etwa 200 mg/ml liegt (Gaginella et al. 1974), ist in der zuinnerst gelegenen Polymerschicht von dieser Konzentration auszugehen. Da sich trotz jener uneinheitlichen Geometrie der Diffusionsstelle spätestens nach einigen Stunden - jedenfalls beim Schlauchmaterial a) - ein "steady state" eingestellt hat, herrscht im Schlauch ein gleichbleibender Konzentrationsgradient dC/dx und damit nach dem Fickschen Gesetz (Gleichung 7 auf Seite 16) ein konstanter Fluß dn/dt durch die Schlauchmembran nach außen.

In der äußersten Schicht ist die Nicotinkonzentration gegenüber der Innenkonzentration recht klein, weil das Nicotin schon bei neutralem pH-Wert durch Protonierung dem Diffusionsprozeß weitgehend entzogen wird und die Außenkonzentration auch der anderen Dissoziationsstufen ohnehin durch den Abtransport in die Körpergewebe recht

gering ist. Daher kann an dieser Grenzfläche die Einrechnung des Verteilungsvorganges auch entfallen.

Das hier beschriebene NAS beruht in seiner Funktion auf den dargestellten theoretischen Grundlagen einerseits und andererseits auf den aus der Literatur bekannten Erfahrungen mit vergleichbaren anderen Systemen. In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse von Gaginella u. Bass (1974) von besonderer Bedeutung.

Durch folgende Maßnahmen wurden allerdings demgegenüber entscheidende Verbesserungen erreicht:

Zum einen wurde die Diffusionsfläche auf den frei zugänglichen Bezirk über dem Loch des Glasreservoirs reduziert und damit für die gesamte Abgabedauer festgelegt. Zum anderen hält die Starre des Glaskörpers die Wandstärke des Schlauches an der Austrittsstelle konstant, indem der gesamte Schlauchabschnitt mit mechanischer Spannung fixiert wird. Die dritte Maßnahme bestand in der Anwendung unvermischter Nicotinbase - dadurch ändert sich die Innenkonzentration auch über längere Zeit nicht.

Drei Eigenschaften dieses Gerätes führen nach dem ersten Fickschen Gesetz zur zeitkonstanten Abgabe von Nicotin: Die Innenkonzentration wird, da es sich um eine Reinsubstanz handelt, stets bei etwa 6,2 Mol/l aufrechterhalten, und die Außenkonzentration ist wegen der raschen Verteilung in die Umgebung mit anschließender Protonierung sehr klein. Dies führt bei konstanter Wanddicke zu einem stets gleichbleibenden Konzentrationsgradienten dC/dx . Außer der festen Querschnittsfläche Q beeinflusst noch die Diffusionskonstante D die Abgabegeschwindigkeit. In dieser Konstanten sind Material- und Temperatureinflüsse zusammengefaßt.

Eine Schwankung der Abgaberate ist also in erster Linie von der schwankenden Umgebungstemperatur her zu erwarten. Die Temperaturabhängigkeit ist bei Diffusionsvorgängen unvermeidlich; schließlich ist die Wärmebewegung der Moleküle ja die treibende Kraft für diese Art des Stofftransportes. Der Einfluß der Temperatur auf die Abgaberate muß daher experimentell untersucht werden, um sein Ausmaß festzustellen. Bei der Messung der Abgaberate empfiehlt sich dagegen eine wirksame Thermostatisierung zur Eliminierung des Störfaktors Temperaturschwankung.

3.4 Störeinflüsse

Trotz der getroffenen Maßnahmen, die dem NAS zu einer Kinetik nullter Ordnung verhelfen, sind weitere mögliche Störeinflüsse - nennenswerte, wie die bereits diskutierten Temperatureinflüsse, und vernachlässigbare - zu berücksichtigen.

Die Diffusionskonstante D ist nach Barrer (1951) in vielen Fällen von der im Polymer gelösten Stoffmenge abhängig.

Da Siliconkautschuk recht große Mengen Nicotin aufnimmt, scheint dies im vorliegenden Fall durchaus auch möglich; ebenso kann die Wandstärke durch Quellung zunehmen. Im "steady state" sind diese Vorgänge jedoch ohne Einfluß, da bei bereits eingestelltem Konzentrationsgefälle keine weiteren Beeinflussungen der Diffusionskonstanten D und der Wandstärke d zu erwarten sind. Wird dieses Gleichgewicht allerdings durch starke Temperaturänderungen gestört, so müssen jeweils einige Stunden mit konstanter Temperatur vergehen, bis Quellungs- und Diffusionsgleichgewichte wiederhergestellt

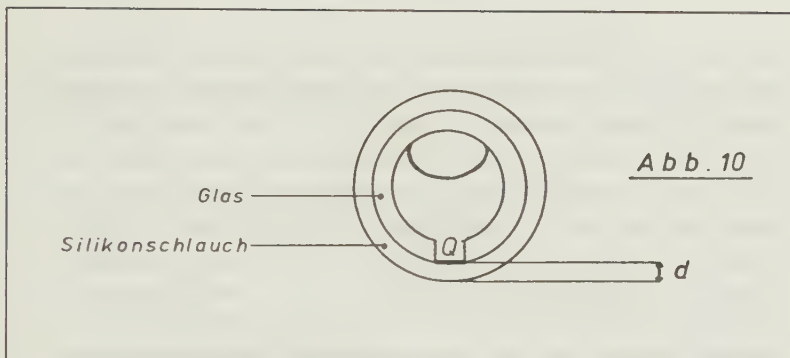


Abbildung 10: Nicotinabgebende Stelle im Querschnitt des NAS;
Position von Querschnittsfläche Q und Wandstärke d.

sind. Die genaue Kenntnis der Diffusionskonstanten könnte allerdings für eine Vorausschätzung der Abgaberate von Wert sein, wenn die Quellungsvorgänge einschätzbar wären und vor allem für die komplizierte Geometrie der Abgabestelle (Abb.10) eine spezielle Gleichung zur Verfügung stünde.

Die den verfügbaren Siliconschläuchen zugemischten Füllstoffe (Siliciumdioxid zum Beispiel) geben weiteren Anlaß zu Fehlberechnungen der Diffusionskonstanten. Flynn u. Roseman (1971) haben gezeigt, daß die Einflüsse von Füllstoffen nicht nur durch Verdrängung des diffusiblen Polymers zu erklären sind, sondern auch eine Berücksichtigung der (Langmuir-) Absorption verlangen. Auch diese Einflüsse sind im Konzentrationsgleichgewicht ohne Bedeutung für die Konstanz der Abgabe, dagegen kann deren absolute Höhe durchaus beeinflußt sein.

Mit der Zeit entsteht durch die fortgesetzte Abgabe von Nicotin ein Unterdruck im Inneren des Gerätes. Im Gegensatz zu gefüllten Schläuchen, die je nach Wandstärke - dem Außendruck folgend - kollabieren, fällt der Druck im Innern des NAS weiter ab. Da ein Teil des Innenraums aber zur Zeit der Füllung schon zu etwa einem Zehntel aus Luft besteht, Nicotin selbst einen meßbaren Dampfdruck besitzt, und atmosphärische Gase (auch Wasserdampf) die Membran von außen nach innen durchdringen können, ist der Druckverlust begrenzt. Stellt man lediglich die Ausdehnung der Luftblase in Rechnung, so fällt der Innendruck maximal auf ein Zehntel des Außendrucks ab. (Abschätzung: Geht das Volumen des Nicotins von 90% auf 30% des Innenraums zurück, so dehnt sich die Luftblase auf das Siebenfache aus, der Innendruck fällt auf ein Siebtel.)

Die treibende Kraft für den Druckabfall ist der unterschiedliche osmotische Druck in der Innen- und der Außenlösung, der nichts anderes ist als eine Form von gespeicherter Energie. Das diffusible Lösungsmittel ist bei dieser Betrachtung nicht das Wasser, wie sonst bei osmotischen Vorgängen, sondern das Nicotin. Die konzentriertere Lösung ist also die Außenphase, da sie nur geringe Mengen frei diffusibles Nicotin enthält. Dagegen kann man die Innenphase als reines Lösungsmittel auffassen. Obgleich die zur Berechnung nötigen Daten, insbesondere der konzentrationsabhängige van t'Hoff-Koeffizient, nicht zur Verfügung stehen, kann von einem vergleichsweise hohen Druck von mehreren Atmosphären ausgegangen werden, wie die Erfahrungen im wäßrigen Milieu zeigen.

Ob der Einfluß des abfallenden Innendrucks tatsächlich zu vernachlässigen ist, werden die Messungen der Linearität der Abgabe endgültig erweisen. Die festgelegte Größe

der Abgabefläche Q ist eine der Eigenschaften des NAS, die die Konstanz der Abgaberate bedingen. Voraussetzung dafür ist aber die ständige Benetzung mit Nicotin. Kommt nämlich das Loch im Glasreservoir für längere Zeit einmal nach oben zu liegen, so befindet sich schon nach einigen Stunden nur noch wenig Nicotin unter der Membran und die Abgabe kommt zum Erliegen. Die Erfahrung hat zwar gezeigt, daß wegen der Oberflächenspannung immer eine kleine Nicotinmenge im Loch verbleibt; dennoch sollte die "Loch oben"-Position ausgeschlossen werden. In vivo wird deshalb das Gerät mit dem Haken im Tier so verankert, daß die Ratte selbst mit ihrer waagerechten Körperhaltung die Abgabeöffnung stets nach unten hält. Eine weitere Vorsichtsmaßnahme ist die Regel, das NAS nie länger zu verwenden, als sich noch mindestens ein Drittel des eingefüllten Nicotins im Innenraum befindet.

Nicotin ist keine chemisch inerte Substanz. Die Empfindlichkeit gegen Oxidation durch Luftsauerstoff (Wada et al. 1959) und die mikrobielle Zersetzbarkeit - Nicotin ist für Mikroorganismen ungiftig, weil sie weder über Neurone noch über Synapsen verfügen - erfordern daher ebenfalls eine kritische Einschätzung. Allerdings kommt im Innern des NAS eine bakterielle Besiedlung wegen des stark basischen und hyperosmotischen Milieus nicht in Frage. Die O₂-Einflüsse von der Luftblase aus und durch Eindiffusion über die Siliconmembran ermöglichen jedoch in gewissem Rahmen eine Zersetzung des Alkaloids. Die Störwirkung besteht zum einen in der Abnahme der effektiven Nicotinkonzentration, wenn gelöste Abbauprodukte überhandnehmen, und zum anderen in der durch braune, harzartige Zersetzungsprodukte bedingten Viskositäts-erhöhung. Rechnet man für die Zersetzung von 1% des eingefüllten Nicotins (2 mg $\hat{=}$ 12 μ Mol) mit 12 μ Mol

Sauerstoff, entsprechend etwa 300 μ l Gas, so sind hierzu immerhin 1,5 ml Luft notwendig, also das 30- bis 50-fache der im NAS vorhandenen Luftmenge. Obgleich selbst eine so starke Zersetzung noch ohne großen Einfluß auf die Abgaberate bleiben würde, empfiehlt es sich, den Abgabezeitraum zu begrenzen und eine Restmenge Nicotin im Gerät zu belassen, um der Anreicherung von Abbauprodukten zu begegnen.

Die beschriebenen widrigen chemischen und physikalischen Einflüsse stehen also nach dieser Betrachtung einer Abgabelinearität nicht im Wege, sofern zur Vorsicht folgende Vorkehrungen getroffen werden:

- Die Verwendung des NAS sollte beendet werden, wenn das Nicotin nur noch zu etwa einem Drittel der Füllmenge im Hohlraum vorhanden ist.
- Das für die konstante Abgabe wichtige Loch sollte möglichst nach unten weisen.

Inwieweit die Störeinflüsse auch in der Praxis vernachlässigbar sind, zeigen die weiter unten beschriebenen praktischen Versuche.

3.5 Möglichkeiten zur Beeinflussung der Abgaberate

Eine Abänderung der Zufuhrgeschwindigkeit durch das NAS ist vor allem durch unterschiedliche Dimensionierung der folgenden Parameter möglich:

- Querschnittsfläche Q (Änderung der Lochgröße),
- Diffusionskoeffizient D (anderes Schlauchmaterial),
- Wandstärke d der Schlauchmembran, und
- Nicotinkonzentration C_i im Innenraum (genauer: in der innersten Polymerschicht).

Für planare Membranen (Dicke sehr klein gegenüber der Abgabefläche) läßt sich der Einfluß der Querschnittsfläche auf die Abgaberate leicht nach Gleichung 14 voraussagen:

$$(14) \quad dn/dt = C_1 \cdot D \cdot Q \cdot d^{-1} \quad (\text{nach Barrer 1951})$$

Der Zusammenhang ist in Abbildung 11 a) graphisch dargestellt. Da die kreisrunde Abgabefläche über die bekannte Formel $Q = 2 \cdot \pi \cdot r^2$ mit dem Lochradius r zusammenhängt, ist in Abbildung 11 b) zusätzlich die Abhängigkeit der Abgaberate vom Lochradius r gezeichnet.

Es wird jedoch ausdrücklich darauf hingewiesen, daß Gleichung 14 nur eine grobe Annäherung für das tatsächliche Diffusionsverhalten der Siliconmembran (Abbildung 10) darstellt. Die Begrenzungsflächen sind zwar nahezu eben und liegen parallel zueinander, aber der Konzentrationsgradient dC/dx in der Schlauchmembran ist inhomogen.

Dies liegt an der Tatsache, daß nur die innere Abgabefläche Q' durch die Lochgröße festgelegt ist, nach außen aber praktisch die gesamte Außenfläche zur Verfügung steht. Über dem Loch findet allerdings der größte Anteil der Stoffabgabe statt, da hier der Konzentrationsgradient am größten ist.

Trotz dieser Vereinfachung liefert Gleichung 14 immerhin eine Abschätzung, um wieviel das Bohrloch etwa zur Verzehnfachung der Abgaberate vergrößert werden muß. Im

Idealfall (planar) müßte hier der Lochradius nur auf das 3,16-fache erhöht werden ($\sqrt{10} \approx 3,16$).

Die in Abb. 11 a) und b) eingezeichneten Punkte geben in praktischen Versuchen eingesetzte Querschnittsflächen und -radien in Relation zu gemessenen Abgaberaten wieder.

Da der Lochradius aus technischen Gründen nur schwer auf unter 0,3 mm gebohrt werden kann, muß für stark verringerte Abgaberaten ein anderes Schlauchmaterial eingesetzt werden. Gaginella et al. (1974) fanden, daß der Diffusionskoeffizient von Trifluorpropylmethylpolysiloxan (TFPS) um den Faktor 20 niedriger liegt als der von Dimethylpolysiloxan. Auf diese Weise konnte die Abgaberate auf etwa 5% gesenkt werden, ohne daß die Abmessungen des Schlauches geändert werden mußten. Allerdings liegt der Preis für diese TFPS-Schläuche verhältnismäßig hoch.

Auch bei eigenen Versuchen, das NAS mit Fluorsiliconschlauch zu versehen, ergab sich - jedenfalls für die ersten fünf Tage (Abbildung 13 a)) - eine starke Reduktion der Abgabegeschwindigkeit auf weniger als ein Fünftel der entsprechenden Werte für den Dimethylpolysiloxanschlauch. Leider wird das Material langfristig von Nicotin angegriffen, was Gaginella et al. (1974) offenbar nicht aufgefallen ist. Wie Versuch Nr. 8 (Beschreibung in Abschnitt 8) zeigt, ist dennoch die Anwendung im Tierversuch möglich und sinnvoll.

Eine weitere Einflußmöglichkeit besteht in der Änderung der Wanddicke d des Schlauches. Der Verwendung allzu dickwandigen Materials steht allerdings die mangelnde Implantierbarkeit im Wege, die Schläuche mit mehr als 3 mm Wandstärke (solche Implantate wären im Querschnitt fast pfenniggroß!) nicht zuläßt. Bei zu dünnwandigen Schläuchen mit weniger als 0,5 mm Dicke besteht die Gefahr des

Reißens bei mechanischer Beanspruchung. In Abb.11 ist modellhaft die Abhängigkeit der Abgaberate von der Wandstärke bei einer planaren Membran (d)) und bei dem Segment einer Hohlkugel (c)) dargestellt. Es ist dabei ersichtlich, daß die Variation der Wandstärke d weniger wirksam ist als die Veränderung des Lochradius r . Experimentell wurde für alle Versuche die gleiche Wanddicke von 1,6 mm eingesetzt, die sich beim Aufziehen wegen der Wandspannung auf weniger als 1 mm reduziert.

Die Möglichkeit, unterschiedliche Konzentrationen von Nicotin in den Innenraum zu füllen, ist zwar bequem zu realisieren, führt aber im allgemeinen zum Verlust der konstanten Abgaberate. Ist Nicotin in einem sehr schwer diffusiblen Medium (z.B. Wasser) gelöst, nimmt die Nicotinkonzentration und damit auch die Freigaberate mit der Zeit immer mehr ab. Falls aber ein leichter diffusibler Stoff (Hexan oder Ethanol zum Beispiel) als Mischungspartner eingesetzt wird, kommt, je nach Mengenanteil und Diffusionskonstante D eine ansteigende oder abfallende Abgaberate in Frage.

Das NAS wurde als "Gerät zur gleichmäßigen Abgabe chemischer Stoffe" - Erfinder M. Horstmann und Prof. Dr.K. Opitz - am 10.6.1980 zum Patent angemeldet (Aktenzeichen P 30 21 848.5).

Abbildung 11:

- a) Abgabegeschwindigkeit dn/dt , aufgetragen gegen die Lochfläche Q' . Die Punkte (o) sind an NAS mit verschiedenen großen, "geblasenen" Löchern gewonnene Wertepaare. Während es sich bei diesen um Paare von Einzelwerten handelt, repräsentiert das kleine Kreuz (+) die Mittelwerte einer kleinen Charge NAS ($n = 4$) mit gebohrten Löchern.

Die durchgezogene Linie ist die Regressionsgerade von Q' auf dn/dt , die der Gleichung

$$(15) \quad dn/dt = 0,28 Q' + 0,11$$

folgt. Der Korrelationskoeffizient ist 0,9705.

- b) Darstellung der Abhängigkeit der Abgaberate vom Lochradius r , wobei die Regressionsgerade aus Teilabbildung a) zu

$$(16) \quad dn/dt = 0,88 r^2 + 0,11$$

transformiert wurde. Die Punkte entsprechen denen in a).

- c) Da es sich hier um theoretische Rechenmodelle handelt, ist die Abgaberate dn/dt in arbiträren Einheiten aufgetragen, wohingegen die Dicke d der Siliconmembran in mm angegeben ist. Die Kurve ist nach

$$(17) \quad dn/dt = 13,3 \cdot 3 \cdot (d + 3) \cdot d^{-1}$$

berechnet worden. Dazu wurde in eine von Barrer (1951) für die Diffusion aus Hohlkugeln angegebene Gleichung als Innenradius 3 mm eingesetzt, und die übrigen Parameter wurden so normiert, daß bei $d = 2$ mm dn/dt gleich 100 wurde. Die Lochfläche Q' wurde dabei als Teil einer Kugeloberfläche mit dem Zentrum des NAS als Mittelpunkt angesehen und die freigebende Membran auf diese Weise als Hohlkugelsegment vereinfacht.

(noch: Abbildung 11:)

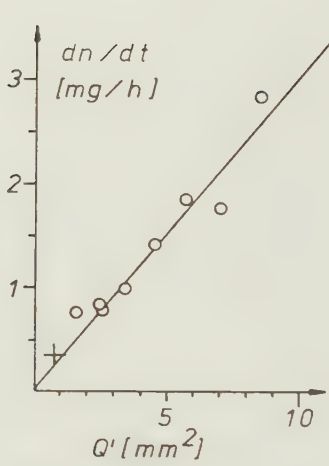
d) gibt den Graphen der Gleichung

$$(18) \quad dn/dt = 200 \cdot d^{-1}$$

wieder. Das Koordinatensystem entspricht c). Auch diese Formel - sie ist aus Gleichung 14 abgeleitet - ist bei $d = 2 \text{ mm}$ auf $dn/dt = 100$ normiert.

Auf diese Weise ist ein direkter Vergleich zwischen der Modellrechnung für die Kugel und der für die ebene Membran möglich. Die mit dem waagrechten Doppelpfeil angedeutete Variationsbreite der Membrandicke d entspricht auf der Seite der Abgaberate in c) etwa einer Erhöhung auf das Doppelte, in d) hingegen auf fast das Dreifache.

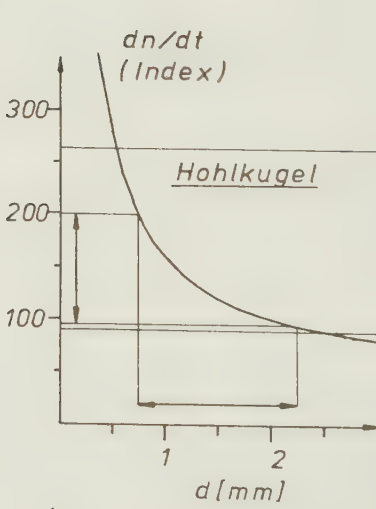
Die beiden Kurven sollen nur als Anhaltspunkt für die tatsächlichen Verhältnisse dienen, da keine experimentellen Daten mit variierter Wandstärke aufgenommen wurden.



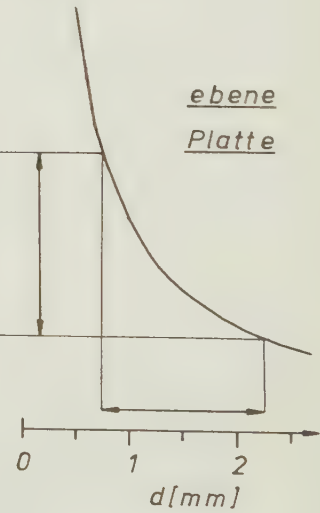
a)



b)



c)



d)

Abb. 11

4. In-vitro-Abgabeverhalten des NAS und einiger anderer Abgabesysteme

4.1 Beurteilung der Diffusionseigenschaften von Siliconschläuchen

Einige Vorversuche sollten erweisen, ob versiegelte Schlauchstücke, wie sie Gaginella et al. (1974) zur Applikation von Nicotin verwandten, ein Abgabeverhalten von akzeptabler Linearität zeigen.

Als Modell wurden Schlauchstücke von 3 cm Länge (Materialien a) und b) auf Seite 29) mit verschiedenen leichtflüchtigen Lösungsmitteln gefüllt und an jedem Ende mit einem Glasstopfen verschlossen. Das Gewicht eines solchen Schlauches (mit der Analysenwaage Mettler H 80 auf 0,1 mg genau gewogen) und die seit der Füllung vergangene Zeit wurden in kurzen Abständen gemessen und notiert.

Abbildung 12 a) zeigt die erfaßte Zeit-Abgabe-Kurve am Beispiel Dichlormethan in Schlauchmaterial a). Die Abgabe setzt nicht unvermittelt ein, sondern es vergeht eine Zeit von etwa 15 bis 20 Minuten, bis sich das Fließgleichgewicht eingestellt hat. Zur Charakterisierung wird für den Schnittpunkt der Ausgleichsgeraden mit der Zeitachse in der Literatur der Begriff "time lag" verwandt. Bei den vorgestellten Versuchen wurden für jedes Lösungsmittel 5 Meßwertpaare aus dem linearen Bereich der Kurve ausgewählt, aus denen die Regressionsgerade und der x-Achsenabschnitt dieser Geraden errechnet wurden. Das "lag" t_L kann nach Barrer (1951) zur Berechnung der Diffusionskonstanten D herangezogen werden:

$$(19) \quad D = \frac{d^2}{6 \cdot t_L}$$

Bei Anwesenheit von Füllstoffen im Schlauch - das ist bei den verwandten Materialien mit Sicherheit der Fall - muß allerdings ein Korrekturfaktor ("tortuosity factor") in die Rechnung einbezogen werden (Flynn u. Roseman 1971). Die nach Gleichung (19) erhaltene Konstante D sollte aber für eine grobe Abschätzung der wahren Diffusionskonstante ausreichen.

Die Diffusivität ist zwar ein wichtiger, aber nicht der einzige bestimmende Faktor für die Abgabegeschwindigkeit. Je größer die Löslichkeit eines Stoffes im Schlauchmaterial ist, desto steiler wird der Konzentrationsgradient in der Wandung. Die Permeabilität ist also das Produkt aus Löslichkeit und Diffusivität (Gaginella et al. 1974):

$$(20) \quad P = D \cdot S$$

Während der "lag"-Phase löst sich der Schlauchinhalt im festen Wandmaterial, ohne daß in gleichem Maße Stoff über die äußere Grenzfläche an die Atmosphäre abgegeben wird. Damit die Abgabe an die umgebende Luft nicht zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wird, können diese Experimente nur mit leicht flüchtigen Substanzen durchgeführt werden (also nicht mit Nicotin selbst). Die in Tabelle 1 aufgeführten Daten geben eine Einschätzung für die starken Einflüsse der Molekülgröße und Lipophilität auf die Permeabilität durch die Siliconmembran. Auch die beträchtlich erschwerte Diffusion durch das fluorierte Silicon wird deutlich.

Tabelle 1

Zur Errechnung der folgenden Werte wurden fünf Punkte aus dem linearen Bereich der Zeit-Abgabe-Kurve entnommen und die Steigung der Regressionsgeraden als Abgabegeschwindigkeit und der (Zeit-) x-Achsenabschnitt als "lag"-Zeit angegeben. Die Korrelation war stets besser als 0,995.

Lösungsmittel	"lag"-Zeit in min	Abgabegeschwin- digkeit in mg/h
---------------	----------------------	------------------------------------

a) Schlauch: Grundmaterial Dimethylpolysiloxan

Wasser, zweifach dest.	1310	0,35
Ethanol, absolut, reinst	30	8,0
Pyridin, rein	24	33
Aceton DAC	10	41
Essigsäure-n-butyl- ester, zur Analyse	25	70
Cyclohexan	19	80
n-Heptan, zur Analyse	13	90
n-Hexan, reinst	9,8	180
n-Pentan	7,3	230
iso-Pentan	6,3	210
Diethylether	7,5	265
Dichlormethan	8,5	350

b) Schlauch: Grundmaterial Trifluorpropylmethyldimethylpolysiloxan

Wasser	3150	0,15
Ethanol	386	0,7
n-Heptan	111	1,2
Pyridin	125	15
Dichlormethan	36	70
Aceton	16	115

Abbildung 12 b) verdeutlicht die Änderungen in der Abgaberate des Stoffes Dichlormethan aus dem Schlauchmaterial a). Bereits vor Erreichen der maximalen Abgaberate war der von außen sichtbare Flüssigkeitsinhalt des Schlauches auf die Hälfte abgesunken, so daß die Voraussetzungen für einen langanhaltenden "steady state" nicht mehr gegeben waren.

Diese ungünstige Abgabecharakteristik würde nicht auftreten, wenn das Lösungsmittel aus einem Reservoir stets nachfließen könnte. Als Konsequenz kommt also die starke Verringerung der Diffusionsfläche auf etwa einen Quadratmillimeter und die Verwendung eines Glasreservoirs wie beim Abgabesystem NAS in Frage.

Auch das NAS zeigt ein mit t_L verzögertes Einsetzen der Stofffreigabe. Formel 19 ist allerdings hier auch mit Korrekturfaktor für den Füllstoffgehalt nicht anwendbar, da die Geometrie der Diffusionsschicht zu inhomogen ist. Wegen mangelnder Eignung der einfachen gravimetrischen Messung wurde zur Feststellung der Abgabekurve das folgende Inkubationsverfahren eingesetzt.

Abbildung 12: Abgabemenge und -rate für Dichlormethan
aus Dimethylpolysiloxanschlauch

- a) Bei Zimmertemperatur (etwa 22°C) aufgenommene Meßpunkte; die Gerade ist die aus den fünf ausgefüllt gezeichneten Punkten ermittelte Regressionsgerade. (t_L - "time lag")
- b) Abgaberate, als $M/\Delta t$ für das jeweilige Intervall zwischen zwei in a) dargestellten aufeinanderfolgenden Meßpunkten berechnet.

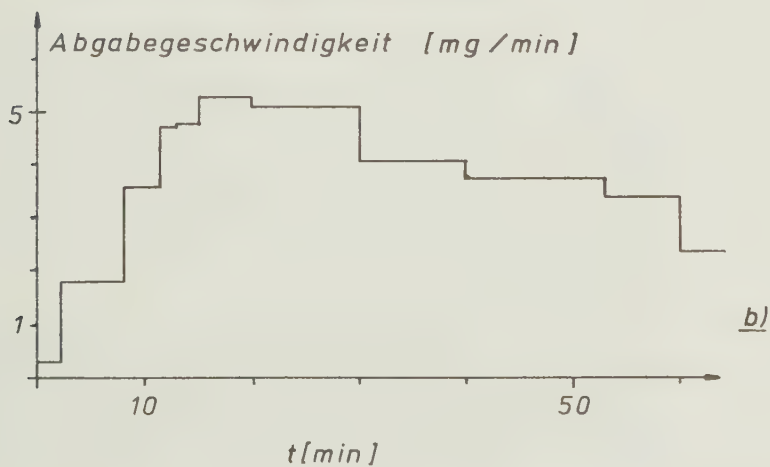
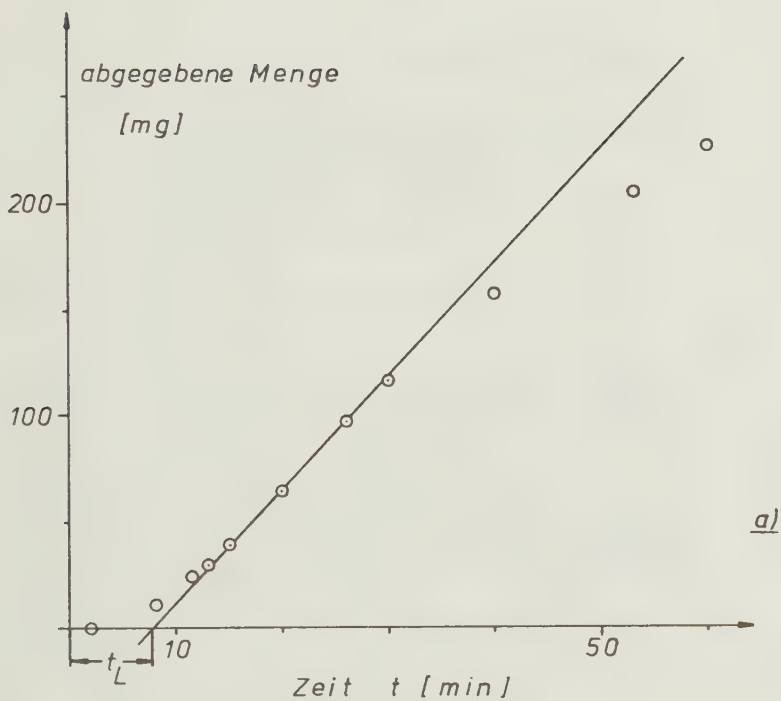


Abb. 12

- Inkubationsverfahren

Material: - Spektralphotometer PMQ III (Zeiss),

- Quarzküvetten (1 cm Schichtdicke)

- Haake-"Ultra-Thermostat" NBS,

- Inkubationsbehälter: Meßkolben 100 ml oder

Schliffreagensgläser 10 ml,

- Citronensäure (zur Analyse, Merck, Art.-Nr. 244),

zu 0,1% in dest. Wasser gelöst ("Dissolutionsmedium").

Zu Beginn der Messung wird zunächst jeweils ein NAS in einen Inkubationsbehälter verbracht und unmittelbar danach bei der vorgeschriebenen Temperatur (20°C) bis zum Eichstrich mit Dissolutionsmedium gefüllt. Durch sofortiges Einsetzen in den Thermostaten wird ein rasches Erreichen der Temperatur des Wasserbades von 38,0°C ermöglicht. Während der folgenden Inkubation muß der Wasserstand im Thermostaten stets etwa auf gleicher Höhe mit dem Pegel in den mit Schliffstopfen sorgfältig verschlossenen Behältern sein.

Zum festgesetzten Zeitpunkt - mehrere Stunden bis ein Tag sind je nach Abgaberate vergangen - wird das verschlossene Gefäß mehrfach gründlich umgeschwenkt und danach ein Teil der Lösung zur spektrophotometrischen Messung in eine Quarzküvette dekantiert. Der Rest des Dissolutionsmediums wird schonend abgegossen und verworfen. Durch Zusatz frischer Citronensäurelösung beginnt der Versuch erneut.

Die Messung der Extinktion geschieht unmittelbar nach der Probenentnahme bei 259,5 nm gegen reine 0,1%-ige Citronensäurelösung. Für die nötige Extinktionskonstanz sorgt die Thermostatisierung der Küvettenbank auf 20°C.

Die Eichgerade in Abbildung 13 b) legt die spezifische Extinktion (auf 1% Nicotinbase berechnet) auf 268 cm^{-1} fest. Daher geschieht die Berechnung der abgegebenen Menge zweckmäßig nach der folgenden Formel:

$$(21) \quad m = 0,0373 \cdot E \cdot V_I \cdot \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$$

(Menge m des Nicotins in mg und Volumen V_I im Inkubationsbehälter in ml)

Damit kann auch die durchschnittliche Abgabegeschwindigkeit als Quotient aus abgegebener Menge nach Gleichung 21 und der Zeitdifferenz zwischen Anfang und Ende der Inkubation berechnet werden.

Führt man die Inkubations-Tests fortlaufend durch, so läßt sich durch Addition der nacheinander abgegebenen Stoffmengen die Gesamtabgabemenge über einen längeren Zeitraum ermitteln.

Als Störquelle, die allerdings bei dem in dieser Weise durchgeführten Verfahren nicht wirksam wurde, kommt die mikrobielle Zersetzung des gelösten Nicotins in

Abbildung 13:

a) Abgabekurve des NAS (mit Fluorsiliconschlauch b)), bei 38°C im Thermostaten nach dem Inkubationsverfahren bestimmt. Die "lag"-Phase beträgt etwa einen Tag. Aus den sechs Punkten des linearen Bereichs der Kurve wurde die Regressionsgerade ermittelt:

$$(22) \quad M(\text{mg}) = 1,02 \cdot t(\text{d}) - 1,05 \quad (\text{Korrelation } 0,9970)$$

b) Eichkurve zur Kontrolle der Linearität der photometrischen Bestimmung, aufgenommen bei $259,5 \text{ nm}$ (20°C). Zwischen Extinktion und Konzentration besteht ein linearer Zusammenhang gemäß Gleichung 21.

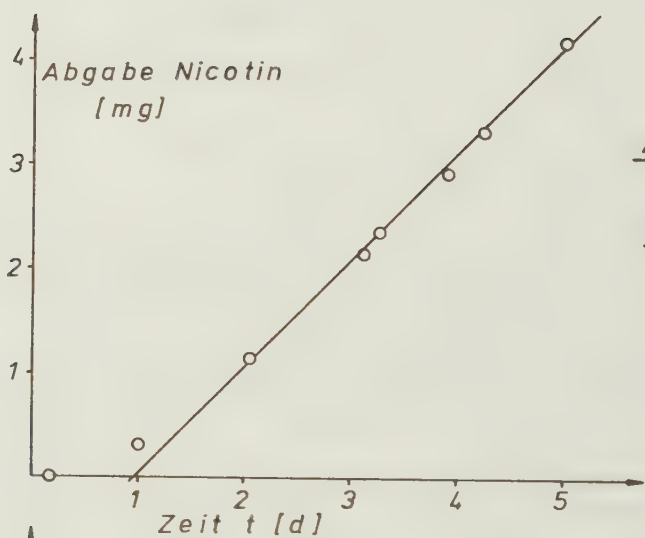
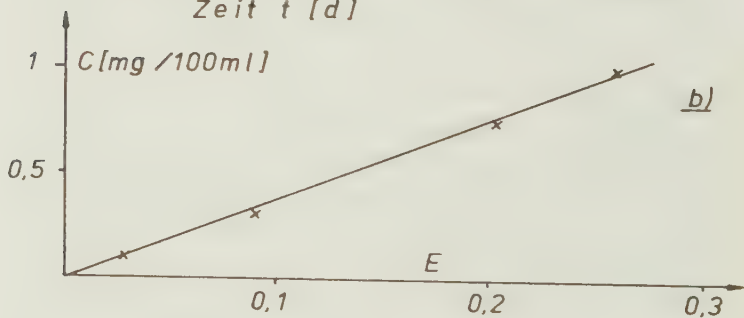


Abb. 13

a)



b)

Frage. Aus diesem Grund wurde das Dissolutionsmedium jeden Tag frisch angesetzt.

Es sollte noch angemerkt sein, daß dieses Meßverfahren - mit einer ungleichmäßigen Konzentration des Stoffes im Außenmedium und ohne ständige Durchmischung der Flüssigkeit - nur für die diffusionskontrollierte Abgabe gut wasserlöslicher Substanzen geeignet ist. Diese Bedingung ist beim Nicotinabgabesystem NAS erfüllt - Nicotin ist in jedem Verhältnis mit Wasser mischbar.

Die mit Hilfe dieses Inkubationsverfahrens ausgeführten Messungen führten zu der in Abb. 13 a) dargestellten Zeit-Abgabe-Kurve eines NAS bei Verwendung von Fluorsiliconschlauch. Die "lag"-Zeit läßt sich als x-Achsenabschnitt leicht ablesen. Erkennbar ist auch, daß die Abgaberate mit etwa 1 mg/d um den Faktor 4 kleiner ist als die Abgabegeschwindigkeit bei Verwendung des einfachen Siliconmaterials a) (s. Abb. 14). Wie sich herausstellte, löst Nicotin das Fluorsiliconmaterial langfristig an, so daß die Abgaberate bei längerer Inkubationsdauer weiter zunimmt. Aus diesem Grunde sind beim Tierversuch Nr. 8 (siehe Abschnitt 8) die Dosisangaben unsicher.

4.2 Messung der Abgabe- und Dosiskonstanz der NAS in vitro

- Abgabekonstanz

Die Prüfung auf konstante Abgaberate erfolgte in diesem Versuch einerseits durch tägliche Bestimmung der abgegebenen Menge mit Hilfe des Inkubationsverfahrens und andererseits - zur Kontrolle - durch Wägung der Geräte vor und nach dem Versuch.

Als "Standard" wurden auch drei alzet^R- "minipumps" (model 2001, ALZA, Palo Alto CA, U.S.A.) mit 25%-iger Lösung von Nicotintartrat (Molekulargewicht 498,4) in destilliertem Wasser gefüllt und ebenso wie die drei NAS der Inkubation unterworfen. (Eine Kontrolle der Freigabe durch Wägung ist bei der "minipump" laut Herstellerangabe (Packungsbeilage) nicht möglich.) Die drei zur Messung bestimmten NAS (aus einer "Sondercharge" mit vergleichsweise kleinem Bohrlochradius von etwa 0,4 mm) wurden vor und nach dem Versuch gewogen und unter denselben Bedingungen wie die alzet^R- "minipumps" inkubiert. Der Versuch dauerte insgesamt neun Tage. Die Ergebnisse des Dissolutionstests gibt Abbildung 14 im einzelnen wieder.

Da für die "minipump" nur für sieben Tage Abgabekonzentanz garantiert ist und die Werte des ersten Tages untypisch sind, wurden für die folgenden Überlegungen nur die verbleibenden sechs Versuchstage berücksichtigt. In Tabelle 2 wurde als Maß für die Gleichförmigkeit der Abgabe bei jedem Gerät Mittelwert und relative Standardabweichung über die sechs Tage gebildet und aufgeführt. In der letzten Spalte ist für jedes einzelne Gerät der Abfall der Abgaberate in % zum Ausgangswert am zweiten Tag angegeben.

Sowohl Abbildung 14 als auch Tabelle 2 zeigen, daß das Abgabeverhalten des NAS - auch im Vergleich zur "minipump" - durchaus genügend zeitkonstant ist, um im Tierversuch einsetzbar zu sein.

Die gleichzeitig durchgeführte Wägung ergab für das NAS eine hinreichende Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dem Dissolutionsversuch. Der Wägung zufolge wurden

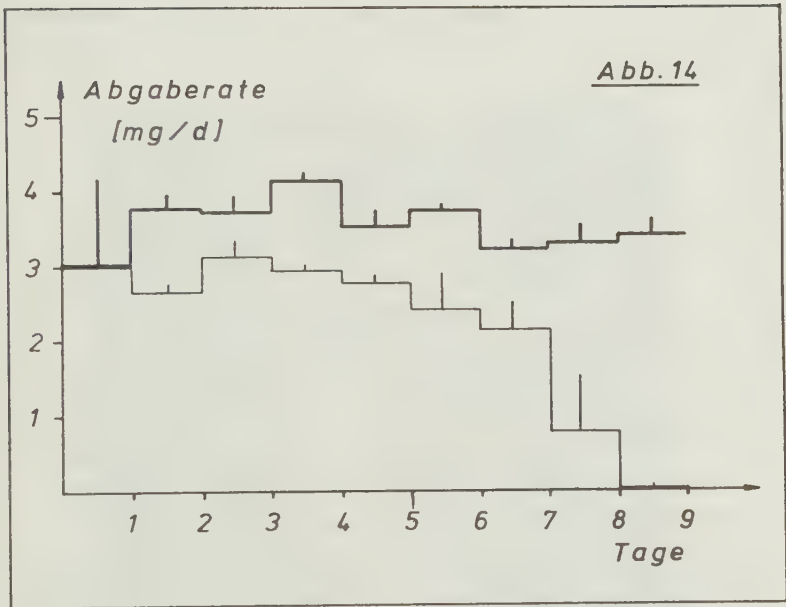


Abbildung 14: Abgaberate in Abhängigkeit von der Zeit

Die Treppenlinien repräsentieren Mittelwerte der Abgaberraten jeweils dreier einzelner Geräte und die senkrechten Striche markieren die Standardabweichung.

Kräftige Linie: Nicotinabgabesystem NAS, mit reinem Nicotin gefüllt,

Dünne Linie: alzet^R-minipump (model 2001), mit 25%-iger Nicotin-tartratlösung gefüllt.

Die Werte wurden mit Hilfe des Inkubationsverfahrens (S.52) ermittelt.

Tabelle 2:

Gerät Nr.	Abgaberate in mg/d (Mittel $\pm$ rel. S.A.)	Abfall der Abgaberate in % vom 2. zum 7. Tag
- alzet ^R - "minipump":		
1	2,76 $\pm$ 6,6%	1,2
2	2,75 $\pm$ 12,0%	21,9
3	2,61 $\pm$ 23,9%	32,3
- Nicotinabgabesystem NAS:		
1	3,69 $\pm$ 8,8%	14,1
2	3,76 $\pm$ 9,2%	18,8
3	3,69 $\pm$ 7,6%	6,7

die Geräte um $30,3 \pm 1,4$ mg Nicotin leichter, während sie nach der Dissolutionsmethode (errechnete Summe der täglichen Abgabemengen) in den neun Tagen im Schnitt $32,1 \pm 1,4$ mg (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) abgegeben hatten. Diese Übereinstimmung erlaubt später bei den Tierversuchen die Feststellung der aufgenommenen Menge durch Wägung vor und nach der Implantationsphase - ein wesentlicher Vorteil zum Beispiel gegenüber der alzet^R- "minipump".

Der Versuch, die "minipump" mit reiner Nicotinbase zu betreiben, mißlang, weil die innere plastische Polymerschicht angelöst wurde und zum Teil - wieder erhärtend - aus der Mündung quoll und diese schließlich verstopfte (siehe Photographie auf der nächsten Seite).

Das neue "model 2ML1" (ALZA) erlaubt zwar aufgrund seiner größeren Füllmenge eine stärkere Nicotinzufuhr

als die "minipump" (model 2001); der Abgabezeitraum bleibt jedoch auf sieben Tage beschränkt. Eine längere Zufuhrdauer (14 Tage) ist nur mit dem "model 2002" möglich, dessen Kapazität (200 μ l) allerdings nicht



Photographie der alzet^R-*"minipump"*, gefüllt mit unverdünnter Nicotinbase. Nach und nach tritt ein zunächst braun, dann weißlich erscheinendes Material aus. Die Größenverhältnisse sind, da es sich bei dem durchsichtigen Außenbehälter um eine Quarzküvette mit der Schichtdicke 1 cm handelt, deutlich sichtbar.

größer ist als die des "model 2001" und somit nicht für die im biologischen Teil dieser Arbeit referierten Tierversuche ausreicht.

- Dosiskonstanz

Für die statistische Aussagekraft von Tierversuchen ist es nützlich, eine hinreichend große Anzahl von Tieren (fünf oder mehr) mit möglichst der gleichen Dosis des zu untersuchenden Pharmakons zu behandeln. Auf die hier beschriebenen NAS angewandt, bedeutet dies, eine größtmögliche Reproduzierbarkeit der Abgaberate zu fordern.

Da es sich aber letzten Endes um handwerklich gefertigte Geräte handelt, sind die Toleranzen für den Gesamtdurchmesser (Einfluß auf die effektive Wandstärke durch Dehnung des Schlauches!) und den Bohrlochdurchmesser als Hauptstörgrößen recht groß. Daher ist grundsätzlich mit einer erheblichen Streuung der Abgaberate zu rechnen. Aus diesem Grunde kommt der Wägung, die ja hier leicht die Ermittlung der vom Einzeltier aufgenommenen Gesamtdosis gestattet, eine besondere Rolle zu.

Für den nun referierten Versuch wurden 17 NAS auf einigemaßen einheitliche Weise geblasen und mit einem Bohrloch versehen. Die Freigaberationen der gefüllten Abgabesysteme wurden nach der Inkubationsmethode auf Seite 52 bestimmt und als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung $5,92 \pm 0,57$ mg/d erhalten. Von den Einzelwerten lag jeweils ein Wert über bzw. unter dem ± 15 Prozent-Bereich um den Mittelwert. Trotz der geringen

Anzahl der geprüften NAS sei hier mit Angaben des Herstellers der alzet^R-"minipump" (Yates 1977) verglichen:

Anzahl untersuchter Geräte		Werte innerhalb des ± 15 Prozent-Bereichs um den Mittelwert
alzet ^R :	?	95%
NAS:	17	88%

Wenn auch die Anzahl der untersuchten Geräte nicht besonders groß ist, so kann dieses Ergebnis doch von der ausreichenden Dosiskonstanz überzeugen.

Abbildung 15:

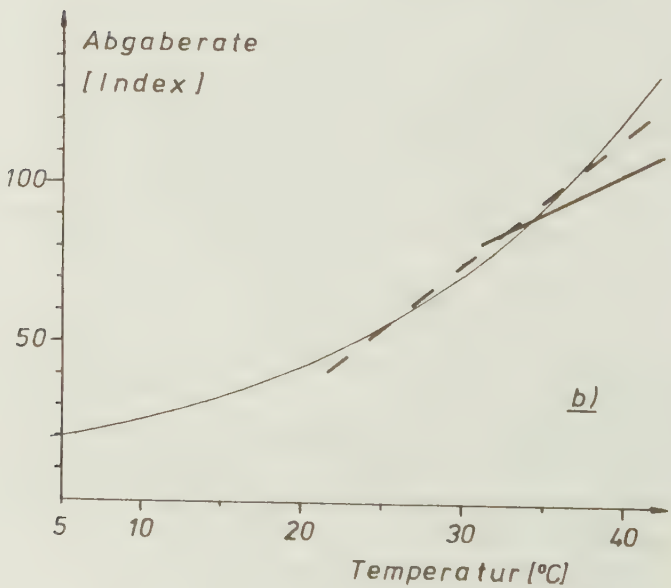
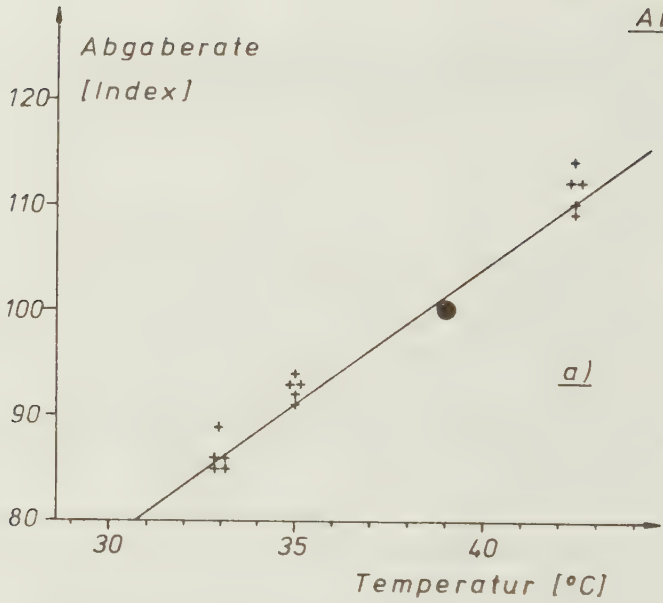
a) In vitro gemessene Abgaberraten des NAS (fünf einzelne Geräte) bei verschiedenen Badtemperaturen im Thermostaten. Die Werte für jeweils ein NAS wurden so normiert, daß der 39°C-Meßwert auf 100 indexiert wurde - somit entspricht der ausgefüllte Kreis 5 Einzelwerten. Die übrigen Meßwerte sind als Kreuze eingezeichnet, deren Regressionsgerade, die mit dargestellt ist, der folgenden Gleichung entspricht:

$$(23) \text{ Index} = 2,54 T(^{\circ}\text{C}) + 2,61$$

b) Vergleich der Regressionsgeraden aus a) mit Angaben über die alzet^R-"minipump":

- dicke, ausgezogene Linie: NAS-Regressionsgerade aus a), Temperaturbereich 33 bis 42°C;
- dicke, unterbrochene Linie: "minipump", lineare Korrekturformel nach Yates (1979 a) von 22 bis 42°C;
- dünne, ausgezogene Linie: "minipump", exponentielle Korrekturformel nach Yates (1979 b) von 4 bis 42°C.

Abb. 15



Bei den Tierexperimenten sollten allerdings nur solche Geräte eingesetzt werden, die einem gemeinsamen Herstellungsgang entstammen, da die Unterschiede zwischen den Einzelgeräten dann am geringsten sind. Unter den Bedingungen einer vielleicht später möglichen "industriellen" Fertigung dürfte das NAS der alzet^R- "minipump" mindestens ebenbürtig sein.

4.3 Temperaturabhängigkeit

Brandt (1959) beschäftigte sich mit Modellrechnungen für die Temperaturabhängigkeit der Diffusion von kleinen Molekülen durch Hochpolymere. Ohne im einzelnen auf seine theoretischen Ausführungen einzugehen, sei die Formel für die Temperaturabhängigkeit der Diffusionskonstanten D , von der er ausging, wie folgt wiedergegeben:

$$(24) \quad D = D_0 \cdot e^{-(E_D \cdot R_T^{-1} \cdot T^{-1})}$$

Da auch der Verteilungskoeffizient zwischen Nicotin und Siliconkautschuk temperaturabhängig ist, wurde der experimentelle Weg zur Ermittlung des Temperatureinflusses auf die Abgaberate des NAS eingeschlagen. Zu diesem Zweck wurden fünf NAS bei vier verschiedenen Badtemperaturen mit dem Inkubationsverfahren (Seite 52) untersucht. Abbildung 15 a) zeigt die Meßpunkte mit der Regressionsgeraden.

Da in dem zugrundeliegenden Temperaturbereich keine Notwendigkeit für eine nichtlineare Beschreibung des Zusammenhangs besteht, kann zwischen 33 und 42°C als Faustregel eine Änderung der Abgaberate von 2,5% pro Grad angenommen werden. Die bei den meisten in-vitro-

Messungen eingestellte Temperatur von 38 °C liegt jedoch so nahe bei der Körpertemperatur der Ratte, daß sogar der in den ersten Tagen nach Implantation eintretende Körpertemperaturabfall auf etwa 35°C (siehe Abbildung 30 auf Seite 138) die Zufuhr rate nur um weniger als 10 % verringern kann.

Die vorliegenden Daten belegen, daß das NAS in "Dosiskonstanz", Gleichmäßigkeit der Abgaberate und Temperaturabhängigkeit durchaus den Anforderungen für tierexperimentelle Untersuchungen entspricht und darüberhinaus die Qualität kommerziell erhältlicher Abgabesysteme erreicht. Gegenüber der alzet^R- "minipump", die für reine Nicotinbase ungeeignet ist, besteht zusätzlich die Möglichkeit der Kontrolle der abgegebenen Stoffmenge durch Wägung.

5. Kontinuierliche Nicotinabgabe im Tierversuch an der Ratte

Erst der Versuch am lebenden Tier kann zeigen, ob die NAS tatsächlich für mehrere Wochen gleichmäßig Nicotin abgeben. Hierzu ist es unerlässlich, die Nicotinkonzentration im Blut oder im Gewebe zu verschiedenen Zeitpunkten zu bestimmen.

Huberman et al. (1977) bestimmten die Amphetaminkonzentration im Hirn von Ratten, denen sie vorher "slow release pellets" implantiert hatten. Es ergab sich dabei ein langsamer Abfall des Amphetamingehaltes. Dieses Vorgehen hat den Nachteil, daß von demselben Tier nicht mehrmals hintereinander Proben entnommen werden können.

Stolerman et al. (1973), die ihr bereits erwähntes Nicotin-"Reservoir" bei Untersuchungen der Spontanaktivität von Ratten einsetzten, führten keine Messungen des Nicotiningehalts im Blut oder in Organen durch. Stattdessen bestimmten sie täglich die im Implantat verbliebene Nicotinmenge und füllten jeweils wieder frische Lösung ein. Auf diese Weise war zwar eine Schätzung der im Schnitt aufgenommenen Menge (bis zu 14,4 mg/kg Nicotin täglich) möglich, aber keine Aussage über die Gleichmäßigkeit der Abgabe. Das tägliche Wechseln der im Gerät enthaltenen Nicotintartratlösung bedeutet überdies eine erhebliche Störung der Tiere.

Gaginella u. Bass (1974) führten in-vivo-Untersuchungen mit nicotingefüllten Siliconschläuchen durch. Trifluorpropylmethylpolysiloxan-(TFPS-)Schläu-

che von 1,5 cm Länge (Innendurchmesser 0,4 cm; Außendurchmesser 0,6 cm) wurden mit 100 mg radioaktiv markiertem Nicotin (Zusatz von ^{14}C -Methyl-Nicotin) gefüllt und etwa 400 g schweren männlichen Ratten subcutan implantiert. Nach 1, 2, 4, 6, 8 und 24 Stunden wurden den Tieren Blutproben von 0,4 ml durch Herzpunktion entnommen. Die erste Probeentnahme wurde von 5 Tieren überlebt; nach der letzten Blutentnahme waren vier davon gestorben (!).

Die Beurteilung der Abgaberate geschah über die Bestimmung der ^{14}C -Gesamtaktivität im Blut, die von der vierten Stunde an ("lag"-Phase) linear anstieg. Da bei dieser Methode alle Metaboliten miterfaßt werden, konnten keine Nicotinkonzentrationen angegeben werden. Auch Daten über die vorherige in-vitro-Abgabe der eingepflanzten Schläuche fehlen, so daß keine Anhaltspunkte für die tatsächlich aufgenommene Menge des Alkaloids vorliegen.

Gaginella u. Bass (1974) setzten auch unfluorierte Siliconmaterialien in vivo ein, die Nicotin wesentlich schneller (Gaginella et al. 1974) abgeben. Keines der Tiere überlebte eine solche Implantation um längere Zeit als vier Stunden, obwohl statt 100 mg nur 15 mg eingefüllt worden waren.

Für die eigenen Experimente kommen wegen der geschilderten Problematik nur

- die direkte und spezifische Bestimmung der Wirksubstanz Nicotin im Blut bzw. Plasma,
- nicht zu häufig wiederholte, schonende Blutgewinnung in vergleichsweise kleinen Mengen,

- und die vorherige Messung der in-vitro-Abgabe der zu implantierenden NAS (bzw. Kontrolle durch Wägung) in Frage.

Nach anfänglichen Versuchen, Blut für die Nicotinbestimmung aus der Zungenvene zu entnehmen, wurde die Entnahme aus der Schwanzspitze der Ratte bevorzugt; das Kontaminationsrisiko durch das mit dem Speichel konzentriert ausgeschiedene (Russell und Feyerabend 1978) Nicotin ist bei der erstgenannten Methode allzu groß. Nach Arola et al. (1980) beeinflusst die Entnahme aus der Schwanzspitze zudem die Konzentration wichtiger Stoffwechselmetaboliten vergleichsweise wenig, was auf die relativ geringe Beunruhigung der Tiere zurückgeführt wird.

Die Bestimmung des Nicotins erfordert wegen der zu erwartenden geringen Konzentration, der Wasserdampf- flüchtigkeit und der Oxidationsempfindlichkeit des Alkaloids besondere Maßnahmen der Probenaufarbeitung und hochempfindliche, spezielle Meßapparaturen.

Wegen der Bedeutung des Nicotins als Tabakrauchbestandteil besteht allgemein großes Interesse am quantitativen Nachweis des Alkaloids auch und vor allem im Blut des Rauchers. Nicotin wurde zwar als eines der ersten Alkaloide überhaupt gaschromatographisch bestimmt (Quin 1958), die verlässliche Messung im Blut von Rauchern war allerdings erst mit dem Flammenionisationsdetektor (Isaac u. Rand 1972) und später mit dem Stickstoff-spezifischen Detektor (Feyerabend u. Russell 1979) möglich. Die Selektivität des Detektors ist also von großer Bedeutung für die Qualität der Meßergebnisse.

Besonders Nicotin-spezifisch ist die massenspektrometrische Detektion. Nach der gaschromatographischen Abtrennung wird das Nicotin hier unter Einfluß einer Elektronenquelle fragmentiert und anschließend im magnetischen Feld einer Auftrennung seiner Massenfragmente unterworfen. Da bei der spezifischen Masse (relative Masse / Ladung) 84 die größte relative Häufigkeit, gemessen durch den Ionenstrom, im Massenspektrum vorliegt (siehe Abbildung 17), ist dieses ionisierte Fragment für die Detektion zweckmäßigerweise heranzuziehen.

Dow u. Hall (1977) wandten diese Methode an und benutzten Chinolin bei der relativen Masse 129 als inneren Standard. Ein innerer Standard wird der Probe in bekannter Konzentration zugesetzt und durchläuft dann den gesamten Extraktionsvorgang in gleicher Weise wie in diesem Fall das Nicotin. Die dazu auszuwählende Substanz sollte in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften daher dem Nicotin möglichst ähnlich sein. Gruenke et al. (1979) verwandten deshalb für die massenspektrometrische Detektion zweifach deuteriertes Nicotin als internen Standard bei der spezifischen Masse 86 ($84 + 2$).

Voraussetzung für die Sensitivität und Reproduzierbarkeit der Methode ist die Art der Probenvorbereitung. Die Ausschüttelung der Base in ein organisches Lösungsmittel ist ein essentieller Schritt, der oft zur weiteren Reinigung wiederholt angewandt wird. Die Dampfdestillation des wasserdampfgefährlichen Alkaloids (Werle u. Becker 1942) ist zur Abtrennung zwar gut geeignet, aber zeitaufwendig und durch Adsorptionsein-

flüsse in ihrer Reproduzierbarkeit gefährdet. (Burrows et al. (1971) wandten diese Methode der Probenvorbereitung an.) Die Mikroextraktionstechnik von Feyerabend u. Russell (1979) nutzt die Flüchtigkeit des Extraktionsmittels Ether, um das Volumen des eingengten Auszugs weiter zu verringern. Nach Aufnahme mit Salzsäure wird in Butylacetat ausgeschüttelt und in den Gaschromatographen injiziert.

Die Erfassungsgrenze der angeführten gaschromatographischen Techniken liegt zwar (beim Stickstoff-spezifischen Detektor) bei nur etwa 5 pg, direkt auf die Säule gebracht, die praktische Grenze ist jedoch aufgrund widriger Einflüsse bei erheblich größeren Mengen anzusetzen. In diesem Zusammenhang ist das Auftreten von Nicotin-"blanks" im Blutplasma von Nichtrauchern zu betrachten. Falkman et al. (1975) untersuchten den Substanz-"Peak", der im Extrakt von Nichtraucher-Blutplasma bei der Retentionszeit des Nicotins auftritt, genauer und identifizierten ihn aufgrund des Massenspektrums als Nicotin. Sie waren der Ansicht, daß Nichtraucher geringe, aber meßbare Mengen Nicotin aus der Luft aufnehmen. Feyerabend u. Russell (1979) stellten bei einem Nichtraucher nach "Passivrauchen" 3,4 ng/ml Nicotin im Blutplasma fest, während rauchmeidende Nichtraucher weitaus niedrigere Blutspiegel aufwiesen.

Kontamination während der Probenaufarbeitung und die Anwesenheit von Nicotinspuren in Lösungsmitteln und Chemikalien spielen ebenfalls eine große Rolle (Feyerabend u. Russell 1980). Eine Untersuchung von Grubner et al. (1980) zeigte darüberhinaus, daß Nicotin

von vielen Materialien adsorbiert und damit der analytischen Bestimmung entzogen wird. Danach zeigt Pyrexglas vergleichsweise schwache Adsorption, wohingegen Kunststoffe (Polyvinylchlorid) erhebliche Mengen an sich binden. Nicht zuletzt beruht die Funktion des hier zu prüfenden Nicotinabgabesystems ja auf der diffusionsfähigen Eigenschaft des verwendeten Materials Siliconkautschuk.

Hartvig et al. (1979) führen vor der Bestimmung eine Derivatisierung des Nicotins durch, um Verlusten und Kontamination entgegenzuwirken. Anschließend wird eine gaschromatische Trennung ausgeführt.

Die bis jetzt beschriebenen unterschiedlichen gaschromatographischen Verfahren sind erfolgreich zur Bestimmung der Nicotinspiegel bei Rauchern - die im Mittel bei etwa 30 ng/ml Blutplasma liegen (Russell et al. (1975), aus nMol/l umgerechnet) - verwandt worden. Mit einem automatisierten Radioimmunoassay führten Castro et al. (1979) die Bestimmung von Nicotin im Blutplasma von Rauchern durch. Die Erfassungsgrenze wurde hier mit 10 ng/ml angegeben.

Die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) ist zwar eine schnelle und elegante, aber nicht besonders empfindliche Bestimmungsmethode für Nicotin, da die üblichen Detektoren (meist auf der Basis der Spektralphotometrie) nicht genügend sensitiv sind. Immerhin erlaubt die Meßbarkeit von 5 ng Nicotin, direkt auf die Säule gegeben, die gleichzeitige Bestimmung von Nicotin und seinem Metaboliten Cotinin im Urin von Rauchern (Watson 1977).

Für das analytische Problem der vorliegenden Arbeit - zu erwartende hohe Blutpiegel bei geringen Probenvolumina - lassen sich also einige methodische Forderungen aufstellen:

- Anwendung einer Mikroextraktionstechnik zur hohen Ausbeute von Nicotin aus der Probe,
- Schutz der verwandten Geräte und Chemikalien vor der Kontamination (etwa durch Zigarettenrauch),
- schnelle Aufarbeitung der Proben und Ampullierung der präparierten Extrakte als Schutz vor Verdunstung und Verunreinigung,
- Einsatz der Gaschromatographie mit massenspezifischer Detektion (SIR - selected ion recording) zur endgültigen Bestimmung.

5.1 Versuchsdurchführung °)

22 weibliche Sprague-Dawley-Ratten wurden von der Firma Willi Gassner, Sulzfeld, bezogen und während des Versuches einzeln in Drahtkäfigen (Höhe 18 cm; Grundfläche 15 x 24 cm) gehalten. Futter ("Altromin" Standardfutter für Ratten in Pelletform) war in den Käfigen stets im Überfluß vorhanden, ebenso täglich frisches Trinkwasser (Leitungswasser).

Der Tag-Nacht-Rhythmus wurde in dem nach außen hin abgedunkelten, klimatisierten Tierraum mit einer Schaltautomatik für die künstliche Raumbeleuchtung gesteuert. Die Beleuchtung war von 8 Uhr morgens bis 20 Uhr abends eingeschaltet, von 20 Uhr bis 8 Uhr

°): siehe auch Abschnitt 8 (Tierversuch Nr. 3)

herrschte Dunkelheit. Die Temperatur des Raumes betrug ständig etwa 22°C, die relative Luftfeuchtigkeit ca. 55%.

Zu Beginn des Versuches wurden die Tiere in zwei Gruppen (Gruppe N mit 16 und Gruppe C mit 6 Ratten) so eingeteilt, daß die Körpergewichte im Mittel etwa gleich waren. Für die 16 Tiere der Gruppe N wurde eine ebensogroße Anzahl NAS nach der Beschreibung in Abschnitt 4 vorbereitet und die in-vitro-Abgaberate nach der Inkubationsmethode am Tag vor der Implantation gemessen.

Die Implantation wurde entsprechend Abbildung 16 (siehe Text hierzu) in Ethernarkose ausgeführt; die 16 Ratten der Gruppe N erhielten die nicotinge-füllten NAS, die 6 Kontrolltiere wurden mit leeren Geräten scheinoperiert. 16 Tage später wurden die NAS wieder entfernt; die Technik war dabei entsprechend der umgekehrten Reihenfolge bei der Implantation. Um eventuelle Einflüsse von Tabakrauch auf die Nicotin-Blutspiegel festzustellen, wurde am 8. Tag nach der Implantation mit jeweils der Hälfte der Tiere jeder Gruppe eine Berauchung durchgeführt.

Die Gruppenbezeichnung lautet also endgültig:

- CO - Scheinbehandlung ohne Berauchung, n = 3;
- CR - Scheinbehandlung mit Berauchung, n = 3;
- NO - Nicotinbehandlung ohne Berauchung, n = 6;
- NR - Nicotinbehandlung mit Berauchung, n = 6.

Blutentnahmen fanden am zweiten Tag, am achten (kurz vor der Berauchung) und am zehnten Tag nach der Im-

Abbildung 16:

Methodik bei der Implantation eines NAS

Die nach den Angaben in Abschnitt 3 angefertigten NAS wurden folgendermaßen in die Ratten implantiert:

1. Die Behaarung der Schulter-Nacken-Region wird mit einer elektrischen Schermaschine entfernt.
2. Das Tier wird in einem zylindrischen, mit Ether gesättigte Luft enthaltenden Glasbehälter (Volumen ca. 6 l) in Narkose versetzt.
3. Eine etwa 1,5 cm lange Inzision in die Rückenhaut wird ausgeführt (a).
4. Mit einer stumpfen Schere wird die Haut senkrecht zum Schnitt etwa 2 cm an jeder Seite vorsichtig vom Muskelgewebe abpräpariert.
5. Das Implantat wird (b) unter die Rückenhaut geschoben, wobei auf korrekte Ausrichtung des Hakens zu achten ist.
6. Die Wunde wird (2 bis 4 Nähte) mit chirurgischem Nahtmaterial vernäht (c).

Während der Arbeitsschritte 3 bis 6 hält ein Helfer mit einem ethergetränkten Mulltupfer die Inhalationsnarkose durch gelegentliches Nachtropfen aufrecht.

a)



b)



c)



plantation statt; im Anschluß daran wurden die Proben gleich aufgearbeitet.

- Technik der Blutentnahme

Zur Fixierung des Tieres dient ein zylindrischer Kunststoffbehälter, der nur den Rattenschwanz zur Blutentnahme freigibt.

Die Abmessungen des Behälters: Innendurchmesser 5,4 cm; Außendurchmesser 6,3 cm; Länge innen etwa 19,4 cm, außen 24,3 cm. Die zylindrische Röhre ist an einer Stirnseite mit einem arretierbaren Deckel mit Luftlöchern versehen; der Deckel an der anderen Stirnseite besitzt eine Aussparung für den Schwanz des Tieres. Die Anfertigung wurde freundlicherweise von Herrn Breuer in der instituts-eigenen Werkstatt vorgenommen.

Zur Aufnahme des Blutes wird zuvor pro Tier ein 1,5 ml-Zentrifugenröhrchen aus Polyethylen (Fa. Eppendorf) mit 10 μ l Natriumethylendiamintetraacetatlösung (10%-ig, aus "Titriplex III" - Merck, Art.-Nr. 8418 - hergestellt) gefüllt. Die Lösung läßt man bis zur vollständigen Verdunstung des Wasseranteils bei Zimmertemperatur in nicht kontaminierten Räumen staubfrei eintrocknen.

Zum festgesetzten Zeitpunkt wird die Ratte in den Blutentnahmebehälter gesetzt. Den Schwanz des Tieres erwärmt (hyperämisiert) man in einem Becherglas voll warmem Wasser (etwa 40°C) ungefähr eine halbe Stunde lang. Nach dem sorgfältigen Abtrocknen wird ca. 1 mm von der Spitze des Schwanzes mit einer sauberen, scharfen Schere oder einer frischen Rasierklinge abgekappt.

Das ausfließende Blut wird nun durch Abstreifen entlang der Schwanzvenen in das vorbereitete Röhrchen getropft, bis mehr als 0,2 ml Blut entnommen sind. (Gegebenenfalls muß die Prozedur des Erwärmens und Abtrocknens bei zu schwachem Blutfluß wiederholt werden.)

Die Röhrchen werden nach jeder Blutentnahme sofort verschlossen und zur Gerinnungshemmung stark geschüttelt. Wichtig ist die Aufarbeitung der Blutproben im Verlauf der folgenden Stunden. Zur wiederholten Blutentnahme am selben Tag braucht die Wunde meist nicht neu angeschnitten zu werden, sondern blutet spontan. Der erste Tropfen ist dann zu verwerfen. Bei der Wundheilung entstehen meist keine Probleme.

- Berauchung

Eine etwa 50 l fassende, quaderförmige Kammer aus Metall mit eingekitteten Glasscheiben dient zur Aufnahme der zu berauchenden Tiere. Über eine Saugleitung wird die Luft mit einer Rotationsluftpumpe (Fa. EMI, Utrecht, Type K640) ständig und kontinuierlich entfernt - Geschwindigkeit des Luftstroms 500 l/h - und damit über einen Nebenschluß der Hauptstromrauch von 20 Zigaretten (Marke: "HB" mit Filter) im Verlauf der einstündigen Behandlung gleichmäßig durch die Kammer geleitet. Damit entfällt auf 25 l der Kammerluft rechnerisch der frische Rauch einer Zigarette.

5.2 Meßverfahren zur Bestimmung von Nicotin im Blut

- Material:
- Zentrifugenröhrchen aus Polyethylen mit Deckel, 1,5 ml (Eppendorf);
 - Pipetten mit austauschbarer Spitze, 200 μ l (Eppendorf);
 - Eppendorf Zentrifuge 5412;
 - "Stirrer": "Vortex-Genie", model K 550-GE; (Scientific Industries Inc., Bohemia, N.Y., U.S.A.);
 - Glaszylinderspritze 100 μ l, mit Stahlkanüle (Hamilton);
 - Schmelzpunktkapillaren, beidseitig offen;
 - Siliconschlauch, Durchmesser etwa 3 mm, auf Schmelzpunktkapillaren aufschiebbar,
 - Gasbrenner "Varaflame^R" (Ronson);
 - Trichloressigsäurelösung 20% (Merck, Art.-Nr. 9415);
 - Natriumhydroxidlösung 40% (frisch bereitet aus Natriumhydroxid Merck, Art.-Nr. 6495);
 - trans-1,2-Dichlorethylen (Merck-Schuchardt, Art.-Nr. 803524).

200 μ l des ungerinnbar gemachten Blutes werden in einem Zentrifugenröhrchen mit 200 μ l verdünnter Trichloressigsäure versetzt und sofort kräftig geschüttelt ("Stirrer" Stufe 10). Die Proteinausfällung wird an der Graufärbung der Masse sichtbar. Nach dem Schütteln dürfen dabei keine blutfarbenen Zonen mehr zu sehen sein.

Die anschließende Zentrifugation führt zu einer Abtrennung des Koagulats von der stark sauren, nicotinhaltigen Lösung. 200 μ l des klaren Überstandes werden nun in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführt.

(In diesem Zustand ist bei -40°C eine Lagerung der Proben über einige Wochen möglich.) Die Lösung unterschichtet man nun sorgfältig mit $50\text{ }\mu\text{l}$ Dichlorethylen, die aus der Mikroliterspritze durch die Kanüle zugesetzt werden, damit nicht allzuviel Lösungsmittel verdunstet. Eine halbe Minute lang schüttelt man den Inhalt mit Hilfe des "Stirrers" (wieder auf Stufe 10) und zentrifugiert dann kurz (1 min). Um Adsorptions- und Verdunstungseinflüssen vorzubeugen, wird die organische Phase (Unterstand) sogleich ampulliert:

Aus einer einseitig spitz ausgezogenen Schmelzpunkt-kapillaren aus Glas wird durch Aufstecken eines Stückchens Siliconschlauch eine Mikropipette angefertigt, mit der ein Teil (etwa $30\text{ }\mu\text{l}$) der organischen Phase abgehebert wird. Man saugt noch ein kleines Luftpolster nach und schmilzt dann die Pipettenspitze mit der Gasflamme zu. Auch das obere Ende dieser Glaspipette wird nach Entfernen des Schlauchstückchens verschmolzen.

Innerhalb der nächsten Stunden wird das Röhrchen mit Hilfe einer Ampullensäge geöffnet und der Inhalt der gaschromatographischen Bestimmung unterworfen. Hierzu werden in die Injektionsspritze ($10\text{ }\mu\text{l}$ Fassungsvermögen) eine kleine Menge reines Dichlorethylen ($1\text{ bis }2\text{ }\mu\text{l}$), etwa $1\text{ }\mu\text{l}$ Luft und schließlich $1\text{ bis }6\text{ }\mu\text{l}$ der vorbereiteten Lösung aufgezogen und durch das Septum des Injektors eingespritzt.

Diese Messungen wurden an einem Varian-Gaschromatographen 1400 mit der freundlichen Hilfe von Herrn

Dipl.-Chem. Dr. R. Eckard im Hause selbst durchgeführt. Eine 1,8 m lange, mit Carbowax 20 M/KOH beschickte Säule diente zur Trennung des Nicotins von mitextrahierten Blutbestandteilen. Die Detektion erfolgte mit dem angeschlossenen Varian-Massenspektrographen MAT 112 bei der relativen Masse 84. An dieser Stelle des Nicotin-Massenspektrums (siehe Abbildung 17) liegt ein hoher Peak vor, der zu einer weitgehend spezifischen Nicotindetektion notwendig ist. Bei einer Temperatur von 165°C im Säulenofen betrug die Retentionszeit etwa 5 min (siehe Abbildung 18).

- Auswertung

Bei der Probenaufarbeitung soll durch den Zusatz von Trichloressigsäure eine Adsorption an das Protein-koagulat oder an die lipophile Gefäßwandung durch Protonierung des Nicotins vermieden werden. Das gefällte Protein - es macht etwa ein Viertel des nach der Zentrifugation sichtbaren Gesamtvolumens aus - entstammt sowohl dem Blutplasma als auch Resten zerstörter zellulärer Blutbestandteile. Die Heterogenität der Phasen nach der Zentrifugation bewirkt, daß das Alkaloid im sauren, wäßrigen Überstand konzentrierter vorliegt als in der festen Proteinmasse.

Wegen des festen Mengenverhältnisses ist die Methode bei Einhaltung der Zeiten gut reproduzierbar. Die nachfolgende Ausschüttelung wird mit dem Lösungsmittel trans-1,2-Dichlorethylen durchgeführt, weil es die Detektion des Nicotins bei der relativen Masse 84 vergleichsweise wenig stört (Abbildung 17)

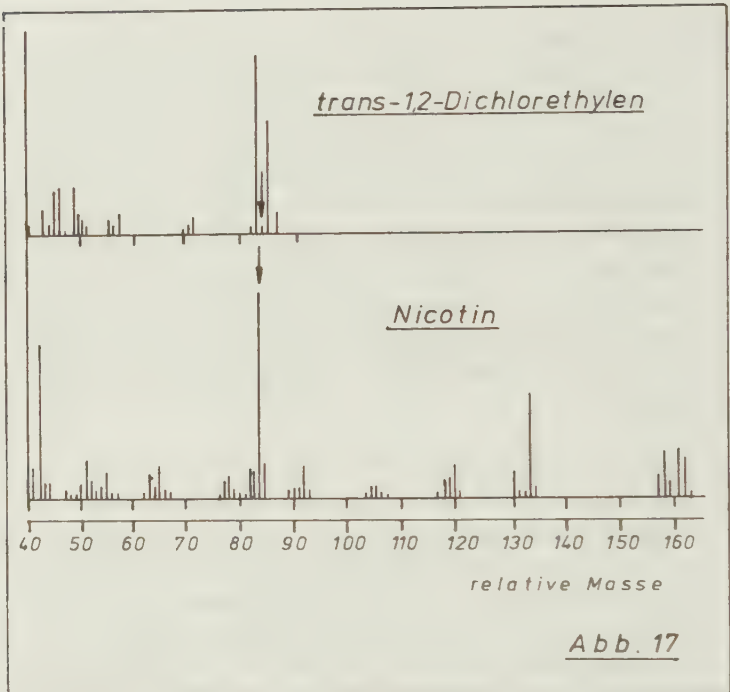


Abbildung 17:

Massenspektren von Nicotin (Molekulargewicht ca. 162) und dem verwendeten Lösungsmittel trans-1,2-Dichlorethylen (Molekulargewicht ca. 97)

Der Peak bei der relativen Masse 84 ist jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet, da hier die Selektivität der Detektion zugunsten Nicotin deutlich wird.

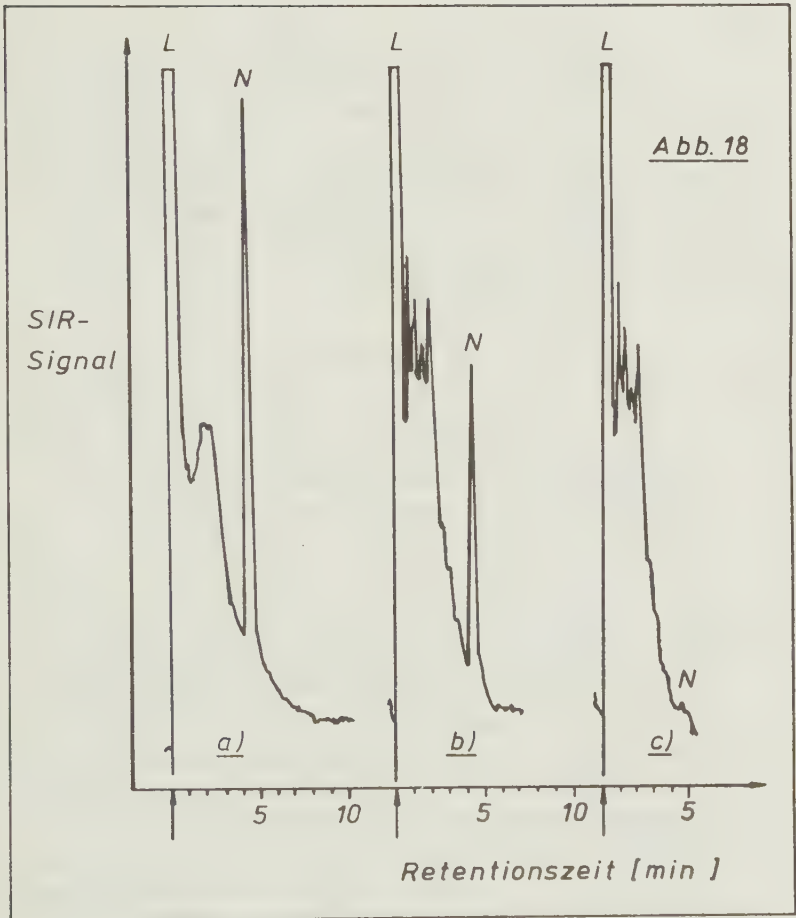


Abbildung 18: Chromatogramme von Probe, Standard und Leerwert

- a) Nicotin-Standard in reinem Lösungsmittel (6,3 ng in 3 μ l),
- b) Probe, aus dem Blut einer behandelten Ratte extrahiert (3 μ l),
- c) Leerwert, von einer unbehandelten Ratte stammend (3 μ l).

Der Lösungsmittel-(trans-1,2-Dichlorethylen-)Peak ist mit "L", der Nicotin-Peak mit "N" bezeichnet. Beim Pfeil fand jeweils die Injektion der Probe statt. (Säulentemperatur 165°C, rel. Masse 84)

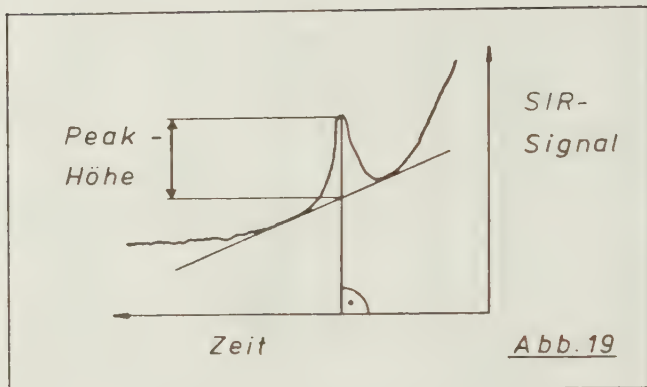


Abbildung 19: Geometrische Konstruktion zur Ermittlung der Peak-Höhe an der Flanke des Lösungsmittel-Peaks.
(SIR - selected ion recording, hier bei der Masse 84)

und eine hohe Wiederfindungsrate erlaubt. Zur Injektion in den Gaschromatographen kamen Extrakte aus dem Blut behandelte Tiere (Proben), aus dem Blut unbehandelter Tiere (Leerwerte) und Nicotinlösung bekannten Gehaltes in reinem Lösungsmittel (Standard). Um die Relation zwischen den Konzentrationen im Extrakt und denen im Blut herzustellen, wurden vier Blutproben unbehandelter Tiere jeweils 342 ng Nicotin (in 200 µl Blut) zugesetzt und nach der Aufarbeitung miteingespritzt (Vergleichswerte).

Zur Auswertung wurde gemäß Abbildung 19 die Peak-Höhe in cm gemessen. Jeder Einspritzung wurde ein Quotient:

$$\text{relative Peak-Höhe} = \frac{\text{Peak-Höhe in cm}}{\text{eingespritzte Menge in } \mu\text{l}}$$

zugeordnet.

Typische Chromatogramme sind in Abbildung 18 zu sehen. In die Folge der Probeninjektionen wurden mehrfach Standards und Leerwerte eingestreut, um eine laufende Kontrolle über die Meßempfindlichkeit zu behalten. Die Nicotinkonzentrationen wurden mit Hilfe einer einfachen Dreisatzrechnung aus der relativen Peak-Höhe der Standard-Konzentration errechnet:

$$(25) \quad C_e = C_s \cdot P_e \cdot P_s^{-1}$$

- C_e - Konzentration im Extrakt (ng/ μ l),
- C_s - Konzentration im Standard (ng/ μ l),
- P_e - relative Peak-Höhe - Extrakt (cm/ μ l),
- P_s - relative Peak-Höhe - Standard (cm/ μ l).

Bei den vier Vergleichswerten ergaben sich so $5,42 \pm 0,15$ ng/ μ l im Extrakt; die dem Blut vorher zugesetzte Nicotinkonzentration betrug $1,71$ ng/ μ l. Diese Relation legt den Umrechnungsfaktor für Proben und Leerwerte fest:

1 ng/ μ l im Extrakt entspricht 315 ng/ml im Blut.

Die Probenaufarbeitung führt also zu einem rund dreifachen Konzentrationsanstieg.

Die Leerwerte enthielten am ersten Tag der Messung (, an dem das Gros der Proben analysiert wurde), nach Gleichung 25 berechnet, im Mittel $0,07 \pm 0,02$ ng/ μ l im Extrakt, am zweiten Tag dagegen $0,25 \pm 0,11$ ng/ μ l (immer Mittelwert $\pm$ Standardabweichung). Der Unterschied ist sehr wahrscheinlich auf eine stärkere Kontamination der zweiten Serie (Tabakrauch) zurückzuführen. Wegen der Inkonstanz der Leerwerte wurden diese nicht

zur "Korrektur" von den gemessenen Probenkonzentrationen abgezogen.

5.3 Ergebnisse

Die vor dem Implantationstermin in vitro ermittelte Abgaberate der NAS betrug in der Gruppe NO ($n = 8$) $0,25 \pm 0,02$ mg/h, in der Gruppe NR ($n = 8$) $0,24 \pm 0,02$ mg/h (Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung). Die Geräte wurden in zufälliger Reihenfolge implantiert.

In Abbildung 20 a) sind die Mittelwerte der Nicotinkonzentrationen im Blut aller behandelten Tiere ($n = 16$) an den drei aufeinanderfolgenden Blutentnahmetermeninen dargestellt. Nach dieser Graphik steigen die Konzentrationen sukzessive an und sind am dritten Meßtag - nach acht Tagen - gegenüber dem Ausgangswert nicht nur nicht abgefallen, sondern sogar statistisch signifikant erhöht. Der Anstieg der Blutspiegel täuscht zwar eine Erhöhung der Abgaberate vor, doch ist hier die Wirkung des Nicotins auf das Körpergewicht in Rechnung zu stellen (Abbildung 20 b)). Die signifikante Erniedrigung des Körpergewichts läßt nämlich das Verteilungsvolumen V , das weitgehend vom Körpergewicht abhängt, absinken, und damit den Blutspiegel b_{ss} nach Gleichung 26 ansteigen.

$$(26) \quad b_{ss} = \frac{k_a^0}{V \cdot k_e} \quad (\text{Symbole wie in Abschnitt 2.1})$$

Die Relation des Blutspiegelanstiegs zum Gewichtsverlust läßt keinen Zweifel daran, daß die Nicotin-

konzentration im Blut nahezu konstant bleibt.
In Gleichung 27 ist die "totale Clearance" - das virtuelle Volumen des inneren Kompartiments B, das pro Zeiteinheit von Nicotin befreit wird - formelmäßig erfaßt:

$$(27) \quad C_{\text{tot}} = V \cdot k_e = \frac{k_a^{\circ}}{b_{ss}}$$

Dieser Wert läßt sich mit Kenntnis von k_a° und b_{ss} für jedes Tier gesondert berechnen. Die insgesamt 45 Einzelwerte für die C_{tot} betragen im Mittel ($\pm$ mittlerer Fehler) $3,06 \pm 0,16 \text{ l} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, was in gutem Einklang mit den Ergebnissen der Arbeit von

Abbildung 20: Nicotin-Blutspiegel bei Versuch Nr. 3

Für jede Tiergruppe sind die Mittelwerte als Blöcke dargestellt und die Standardabweichungen als senkrechte Linien hinzugezeichnet. In a) und b) sind die Meßwerte aller mit Nicotin behandelten Tiere ($n = 16$) zugrundegelegt und Signifikanzen, wenn vorhanden, aufgrund des t-Tests für gepaarte Werte gegen den Anfangswert (2. Tag nach Implantation) angegeben.

In c) werden die berauchten (NR) und unberauchten (NO) Tiere - jeweils $n = 8$ - miteinander verglichen. Hier wurde zwischen diesen beiden Gruppen ein t-Test für unabhängige Werte vorgenommen.

Es bedeutet: n.s. - nicht signifikant

*** - signifikant mit $p < 0,001$

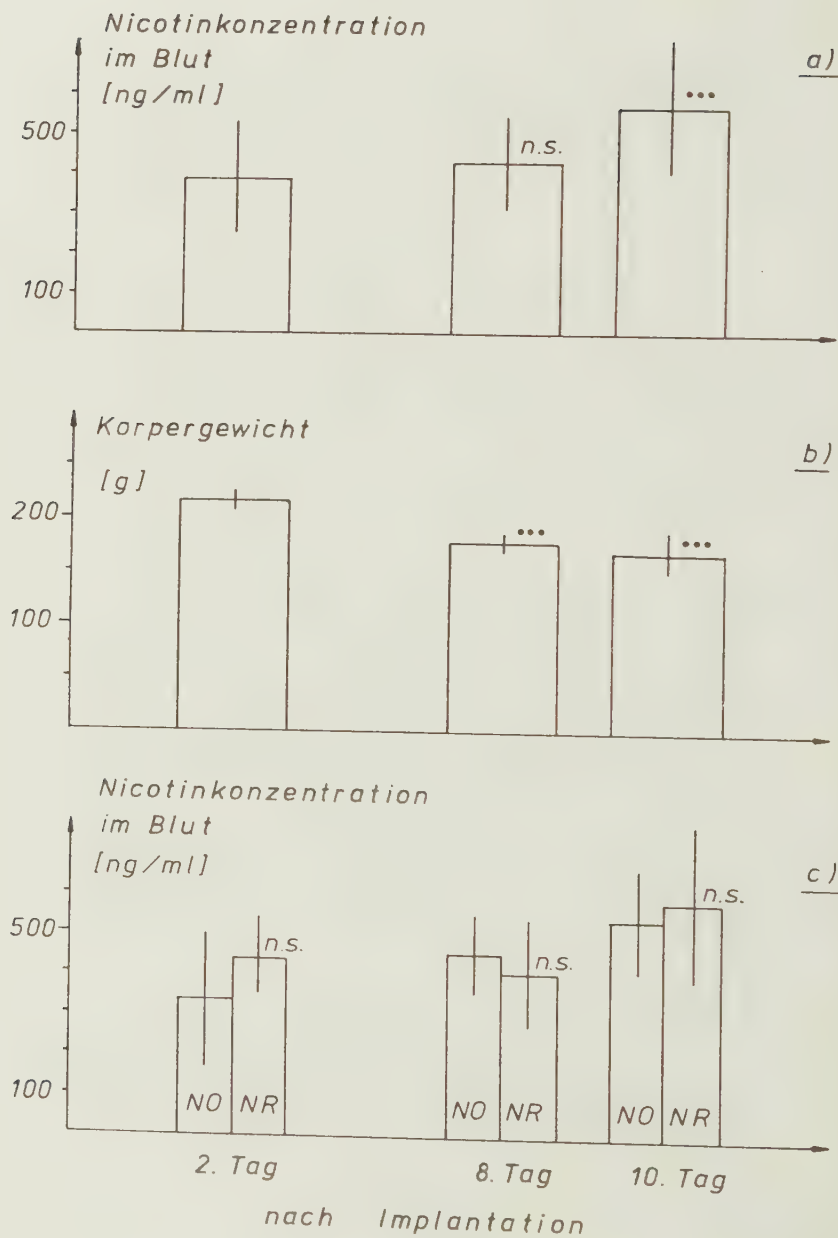


Abb. 20

Miller et al. (1977) steht, in der nach intravenöser Gabe radioaktiv markierten Nicotins je nach Dosis $2,53 \pm 0,12$ bis $4,04 \pm 0,23 \text{ l.kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Mittelwert $\pm$ mittlerer Fehler gefunden wurden.

Abbildung 20 c) stellt den Einfluß der Berauchung auf den Nicotin-Blutspiegel dar. Die Konzentrationen in Gruppe NR sind am 10. Tag nach Implantation nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Die Ergebnisse zeigen, daß das NAS auch in vivo zuverlässig arbeitet und über 10 Tage hinreichend gleichmäßig Nicotin liefert.

6. Einfluß kontinuierlicher Nicotinzufuhr auf die Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme

Im nun folgenden tierexperimentellen Teil der vorliegenden Arbeit wird über pharmakologische Wirkungen des kontinuierlich zugeführten Nicotins bei der Ratte berichtet. Die vorausgehend beschriebene Entwicklung und Herstellung des Nicotinabgabesystems (NAS) bildet die Voraussetzung für solche in-vivo-Versuche.

Gewöhnlich wird Nicotin in einigen wenigen Einzeldosen parenteral zugeführt, um seine pharmakologischen Wirkungen bei Tieren hervorzurufen. Aufgrund der raschen Elimination (siehe Abschnitt 2.1) läßt die Kurzlebigkeit der Substanz im Organismus die akuten Wirkungen jedoch nach kurzer Zeit wieder verschwinden, so daß Toleranzerscheinungen kaum beobachtet werden können. Der Tabak rauchende Mensch hingegen ist dem Nicotin unaufhörlich ausgesetzt. Das ständige Verlangen des abhängigen Rauchers nach einer neuen Zigarette wird stets dann besonders zwingend, wenn die emotional anregenden (oder beruhigenden) Wirkungen der vorher gerauchten Zigarette verflogen sind. Diesem Rückkopplungsprozeß ist der "Kettenraucher" unterworfen, der so durch sein Verhalten für die ständige Anwesenheit von Nicotin in allen Körpergeweben sorgt.

Es liegt in dieser Diskrepanz begründet, daß die nicotinbedingten Folgeerscheinungen, der Verlust an Körpergewicht zum Beispiel, am Tier nur schwer zu reproduzieren sind.

Eine einzelne intravenöse Injektion von Nicotin löst biphasisch zunächst Ganglienstimulation und später Ganglienblock aus. Wegen der raschen Umverteilung und Elimination des Alkaloids ist diese klassische Nicotinwirkung in hohem Maße zeitabhängig und kann sich in Minuten von einem Extrem ins andere bewegen. Die Ergebnisse von Experimenten, bei denen das Alkaloid injiziert worden war, stellen mithin lediglich "Momentaufnahmen" dar und besagen wenig über die Dauerwirkung des Nicotins auf den Organismus. Dieses Problem kann unter Berücksichtigung des zuvor Gesagten durch die gleichmäßige, definierte Zufuhr von Nicotin aus einem biopharmazeutischen Abgabesystem gelöst werden.

6.1 Anorexigene Wirkung

Es ist seit langem bekannt, daß Tabakrauchen den Appetit hemmt (Ramazzini 1718), und das Körpergewicht auf ein niedrigeres Niveau bringt (Khosla u. Lowe 1971). Großen Teilen der Allgemeinheit ist vor allem die Gewichtszunahme nach Aufhören des Rauchens (Brozek u. Keys 1957; Blitzer et al. 1977) geläufig; daher stellt diese Tatsache eine wesentliche Motivation zum Weiterrauchen dar (Comstock u. Stone 1972).

Ursache für die Gewichtsreduktion ist nach Henschler (1980) eine Dauerstimulation des sympatho-adrenalen Systems; beim Menschen ist nach dem Rauchen ein Anstieg des Glucosespiegels (Spohr et al. 1979) und der freien Fettsäuren im Blut feststellbar (Ratzmann et al. 1974). Die Konzentrationserhöhung dieser beiden Energieträger im Blut ist im wesentlichen durch die stimulierende Wirkung des Nicotins auf das Nebennierenmark bedingt.

Dennoch ließ sich an adrenalektomierten Katzen bei nahezu unverändertem Glucosespiegel eine Mobilisierung der unveresterten Fettsäuren erreichen (Milton 1966). Diese Wirkung kommt nach Stock u. Westermann (1963) direkt über eine Stimulation adrenerger Nervenendigungen im Fettgewebe zustande.

Bizzi et al. (1972) konnten diese lipolytische Wirkung an adrenalektomierten Ratten nur dann erzeugen, wenn gleichzeitig 17-Ketosteroide appliziert wurden. Da sich Glucocorticoide selbst als wirkungslos erwiesen, wurde ihnen eine "permissive Wirkung" für die direkte Lipolyse zugeschrieben. Auch bei genetisch fettsüchtigen Mäusen bewirkt Nicotin akut eine Erhöhung der Konzentration freier Fettsäuren im Blutplasma (Batt u. Topping 1979).

Den genannten Wirkungen auf den Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel könnte nach der glucostatischen bzw. lipostatischen Theorie der Regulation der Nahrungsaufnahme eine anorexigene Wirkung zukommen, zum Beispiel als Antwort auf das Sättigkeitssignal "hoher Glucosespiegel".

Dieser Hypothese einer peripher ausgelösten Anorexie widersprechen Münster u. Bättig (1975), indem sie einen zentralen Angriffspunkt für Nicotin postulieren. Hierzu führen die Autoren von ihnen durchgeführte Experimente an, bei denen nur der zentral wirksame Antagonist Mecamylamin, nicht aber das peripher angreifende Hexamethonium, die durch Nicotin ausgelöste Hemmung der spontanen Futteraufnahme zu blockieren vermochte. Ein weiteres Indiz gegen einen vorwiegend peripheren Angriffspunkt stellen die Versuche von

Classen u. Bättig (1976) dar. Männliche Ratten entwickelten unter chronischer Behandlung mit Nicotin eine Anorexie, die erst nach vier Behandlungswochen verschwand, und verloren deutlich an Gewicht. Die gleichzeitig untersuchte Erhöhung des Glucosespiegels war dagegen schon nach wenigen Tagen nicht mehr nachweisbar.

Schmitthenner et al. (1957) infundierten narkotisierten Hunden Nicotinlösung und fanden eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs und des respiratorischen Minutenvolumens. Als Ursache wurde die calorigene Wirkung des Adrenalins angesehen, das den oxidativen Stoffwechsel in den Geweben beschleunigt (Himms-Hagen 1967). Gülker u. Heuer (1981) stellten auch nach chronischer Sympathikolyse beim Hundeherzen in situ eine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs durch Nicotin fest. Erbacher, Grumbrecht u. Loeser (1940) fanden bei täglicher subcutaner Injektion von steigenden Dosen (0,075 bis 2,25 mg pro Tier) Nicotin beim Meerschweinchen zunächst ebenfalls eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs, dann jedoch nach einigen Wochen (bei höherer Dosierung) eine Abschwächung dieses Effekts. Aufgrund histologischer Veränderungen des Schilddrüsengewebes vermuteten diese Autoren, daß die Zunahme des Sauerstoffverbrauchs nach Zufuhr von Nicotin durch Schilddrüsenhormone vermittelt wird.

In diesem Zusammenhang sei angemerkt, daß Andersson et al. (1980) bei der Ratte eine nicotinbedingte Herabsetzung der TSH-Konzentration im Blutplasma fanden. Bei größeren Dosen (ein Zehntel der mittleren letalen Dosis) wurde von Cugurra u. Baldini (1955) bei jungen Ratten erstaunlicherweise eine Verminderung des Sauerstoffverbrauchs gemessen. Es erscheint daher denkbar, daß Nicotin in kleinen Dosen eine stimulierende (calorigene) Wirkung auf den Energiestoffwechsel

ausübt, die sich bei paralytischen Dosen ins Gegenteil verkehrt. Der Mechanismus der Stoffwechselwirkung von Nicotin ist ungeklärt. Bei aktiven Rauchern ist jedenfalls die Sauerstoffaufnahme größer als nach Aufgeben des Rauchens (Glauser et al. 1970).

Das NAS eröffnet nun die Möglichkeit, die Entwicklung des Körpergewichtes isoliert zu analysieren und während der Nicotinzufuhr auftretende Unterschiede zur Kontrollgruppe festzustellen. Dieses Ziel wurde in der Vergangenheit mit der üblichen Injektionsbehandlung nicht immer erreicht. Mit einmaliger subcutaner Applikation von 5 bis 7,5 mg/kg (Smith et al. 1935) oder 3,25 mg/kg (Neuweiler u. Richter 1961) Nicotin täglich konnte keine Änderung des Körpergewichtes von Ratten herbeigeführt werden.

Erbacher, Grumbrecht u. Loeser (1940) waren in dieser Hinsicht allerdings mit einer Dosis von 50 µg, die wachsenden männlichen Ratten von anfangs etwa 50 g Körpergewicht einmal täglich injiziert wurde, erfolgreich; sie konnten eine meßbare Verminderung des Wachstums erzielen.

Averett (1962) behandelte junge männliche Ratten mit täglichen Injektionen von 4,5 mg/kg Nicotin und stellte eine Verringerung des Gewichtswachstums und einen Rückgang des Futterkonsums fest. Diesem Vorgehen werden jedoch schon durch die toxischen Symptome nach der Injektion Grenzen gesetzt.

Als Ausweg, der gleichzeitig dem Muster der chronischen Nicotinaufnahme des Rauchers näherkommt, erkannten Häggendal u. Henning (1980) die Nicotinzufuhr über das Trinkwasser. In Konzentrationen von 25 bis 100 mg/l

zugestzt, führte der Nicotinzusatz dosisabhängig zu einem verringerten Körpergewichtszuwachs männlicher Ratten. Während die Kontrolltiere täglich 45 ml Wasser aufnahmen, tranken mit 50 mg/l behandelte Tiere nur etwa 28 ml. Es ist somit nicht abzugrenzen, inwieweit die ungewollt (evtl. aufgrund der aversiven Wirkung) herabgesetzte Wasseraufnahme für die beobachtete Gewichtsminderung verantwortlich ist.^o) - Die tägliche Menge an aufgenommenem Nicotin lag nach Angabe der Autoren bei 3,9 bis 5 mg/kg bei den mit 50 mg/l behandelten Tieren.

Nimmt man eine starke Störung der Ratten in Kauf, so ist - wie Schechter u. Cook (1976) berichten - eine in achtstündigen Intervallen vorgenommene Injektion von jeweils 0,4 bzw. 0,8 mg/kg Nicotin i.p. ebenfalls geeignet, die Körpergewichtsentwicklung zu drosseln. Appliziert man mit Rücksicht auf die Freßgewohnheiten der Ratte zweimal täglich vor und während der Dunkelphase jeweils 0,4 mg/kg s.c., so sind die - vorwiegend zur Nacht aktiven - Tiere ebenfalls zur Abmagerung zu veranlassen (Classen u. Bättig 1976).

^o): Wie Náquira u. Arqueros (1978) mitteilen, ist die Applikation über das Trinkwasser außer durch den scharfen Geschmack auch durch vorzeitigen Abbau des Nicotins in der Lösung und durch den bei enteraler Resorption verstärkten Metabolismus nachteilig beeinflusst.

Die Trennung zwischen aversiver und pharmakodynamischer Ursache für die herabgesetzte Trinkmenge und vor allem für die Gewichtsminderung ist schwierig.

Nächtliche Injektionen sind daher zur Appetitunterdrückung besonders effizient; bei diesen kann allerdings ein zu starkes Absinken des Wirkspiegels auch nur dann ausgeschlossen werden, wenn häufig genug injiziert wird. Erfolgt die parenterale Zufuhr wiederum allzu oft, wird durch die ständige Belästigung der Tiere eine normale Futteraufnahme unmöglich gemacht; die circadiane Rhythmik der Tiere kann sich verschieben, weil während der ungestörten "nicotinfreien" Hellphase Appetit und Aktivität ausgelöst würden. Während sich der abhängige Raucher durch sein dauerndes Verlangen nach Nicotin in einen ständigen anorektischen Zustand versetzt, erzeugt der Experimentator beim Versuchstier durch zu seltene Injektionen nur abwechselnd Intoxikationen und orexigene Entzugsphasen.

Die Änderung des Körpergewichtes erfordert an sich schon längere Zeit, um als meßbare Wirkung in Erscheinung zu treten. Damit der einzige verursachende Faktor - die Nicotinkonzentration am Wirkort - überhaupt in Relation zu diesem zeitabhängigen Effekt gebracht werden kann, muß diese Konzentration hinreichend lange konstant gehalten werden.

Eine solche Voraussetzung ist durch subcutane Implantation eines NAS in hohem Maße gegeben. Hierzu wurde an 12 männlichen Ratten ein Experiment ^o) (Versuch 1) durchgeführt, bei dem jedem Tier ein NAS für zwei Wochen eingepflanzt wurde.

^o): Die Tierversuche sind in Abschnitt 8 im einzelnen beschrieben.

Die Beeinflussung des Körpergewichtes der mit unterschiedlicher täglicher Zufuhr - 5 bis 40 mg·kg⁻¹·d⁻¹ - behandelten Ratten ist in Abbildung 21 dargestellt. Im Vergleich mit den Literaturangaben erscheint die Dosis zwar hoch; sie erzeugt bei den Tieren aber weder Lähmungen noch Konvulsionen. Als Symptome imponierten außer dem deutlichen Gewichtsabfall struppiges Fell, bei hohen Dosen leichter Tremor und erniedrigte Körpertemperatur. Auffällig war bei den behandelten Tieren weiterhin eine allgemeine Vernachlässigung des Äußeren mit mangelnder Sauberhaltung von Fell und Pfoten. Der Entzug des Nicotins durch Explantation des NAS veranlaßte die Tiere zur Rückkehr zum vorherigen Verhalten, ohne daß unangenehme Entzugserscheinungen sichtbar wurden. Die Gewichtsabnahme drei Tage nach Implantation ist, wie Abbildung 21 und, noch deutlicher, das Korrelogramm in Abbildung 22 zeigen, abhängig von der zugeführten Nicotinmenge.

Keinesfalls ist die gleichmäßige Zufuhr des Alkaloids mit einem ebenso gleichbleibenden Gewichtsabfall verbunden, sondern sie führt in Abhängigkeit von der pro Zeiteinheit zugeführten Nicotinmenge lediglich zum Erreichen eines niedrigeren Körpergewichtsniveaus. Die noch während der Behandlung einsetzende erneute Wachstumsphase verläuft, zumindest bei den Tieren mit mäßiger Nicotinzufuhr, parallel zur Wachstumskurve der Kontrollgruppe und erreicht deren Gewicht erst längere Zeit nach der Explantation.

Ohne für die Gewichtsregulation einen bestimmten Mechanismus zu postulieren, kann die rein deskriptive Benutzung des Begriffes "set point" im Sinne

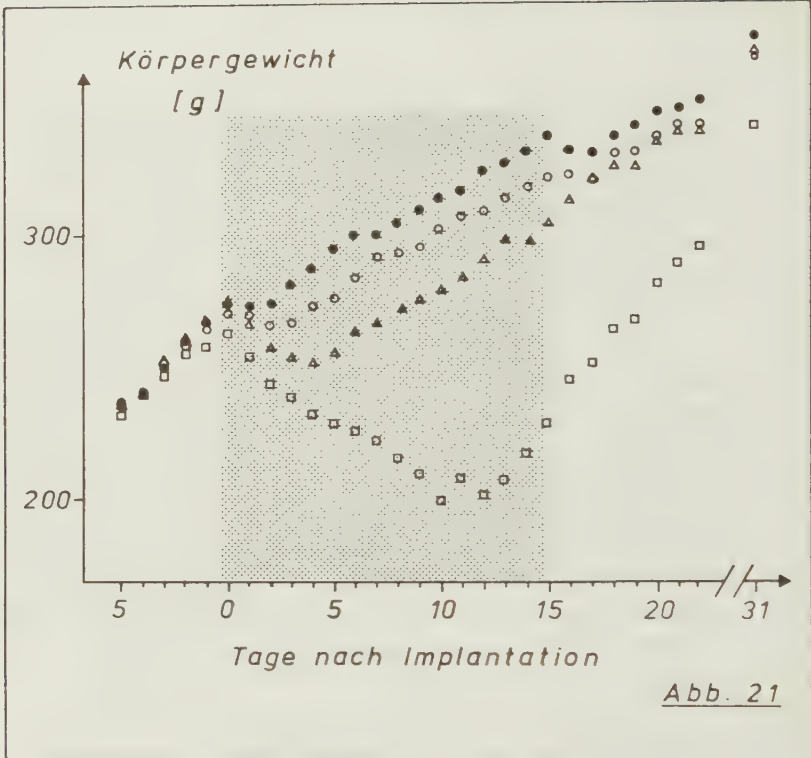


Abbildung 21: Körpergewichtsverlauf bei Versuch 1

Der Zeitraum kontinuierlicher Nicotinzufuhr ist durch die Rasterfläche symbolisiert. (Da die Wägung der Ratten generell zu einem anderen Zeitpunkt erfolgte als die Im-(Ex-)plantation, schließt der Raster hier und auf den noch folgenden Abbildungen nicht genau mit der Abszisseneinteilung ab.) Alle Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Nahrung. Die eingezeichneten Symbole repräsentieren die Mittelwerte für jede Gruppe:

- Gruppe C: $n = 8$ (ab 17. Tag $n = 6$); Scheinbehandlung
- Gruppe N: $n = 6$; $0,25 \pm 0,04 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
- △ Gruppe M: $n = 4$; $0,73 \pm 0,14 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
- Gruppe H: $n = 2$; $1,65 \pm 0,21 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

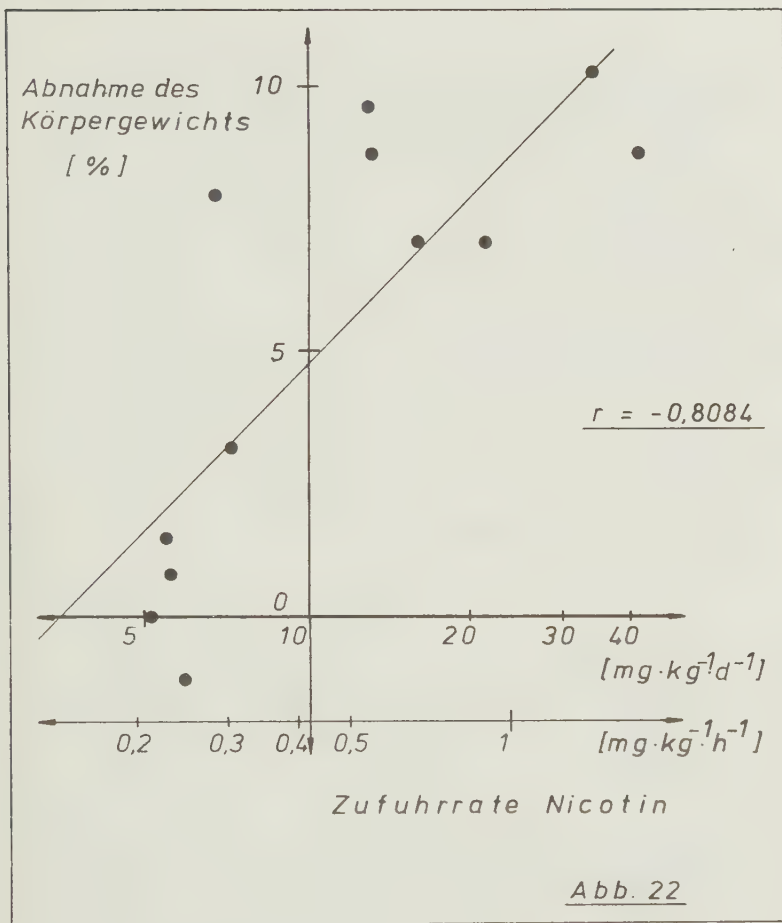


Abbildung 22: Dosisabhängigkeit der Körpergewichtsminderung

Abszisse: Zufuhr rate, für den 1. Tag nach Implantation berechnet (logarithmische Skaleneinteilung),

Ordinate: Nach drei Tagen eingetretener Gewichtsunterschied in Prozent zum ersten Wert (linear aufgetragen).

Zugrundegelegt sind Daten aus Versuch 1.

von Mrosovsky u. Powley (1977) von Nutzen sein. Danach versuchen Tiere und auch Menschen, vor allem durch bewußt oder unbewußt korrigierende Nahrungsaufnahme, ein bevorzugtes Körpergewicht (set point) einzuhalten. So wird bei noch wachsenden Tieren nach zeitlich begrenzter experimenteller Beschränkung der Nahrungsaufnahme das Körpergewicht der Kontrolltiere wieder erreicht, indem die Futteraufnahme entsprechend gesteigert wird. Die in Abbildung 21 dargestellten Vorgänge sind in diesem Sinne beschreibbar: Gleichbleibende Zufuhr des Nicotins sorgt während der gesamten Behandlungsperiode für einen niedrigeren "set point", der - das ist am relativen Minimum der Körpergewichtskurve zu erkennen - bei den zehn Tieren der Gruppen N und M schon nach vier Tagen erreicht ist.

Während der weiteren zehn Behandlungstage bleibt die Gewichts Differenz zur Kontrollgruppe bestehen, und die typische Wachstumskurve wird - freilich auf einem niedrigeren "level" - beibehalten. Erst nach der Explantation des NAS, die nach diesem deskriptiven Modell den alten "set point" reinstalliert, streben die zuvor behandelten Ratten wieder das gleiche Körpergewichtsniveau an wie die Kontrolltiere und kommen diesem schon nach wenigen Tagen sehr nahe.

Mit dem "set point"-Modell ist auch das Senken des "bevorzugten Körpergewichtes" als ein Kriterium für Toleranz gegeben. (Definitionen und Mechanismen von Toleranz werden in Abschnitt 7 im einzelnen erörtert.) Toleranz läge unter diesem Gesichtspunkt dann vor, wenn die Körpergewichtskurve bei fortgesetzter, gleichbleibender Nicotinzufuhr dem Mittel-

wert der Kontrolltiere signifikant näher kommen würde. Auf den Versuch 1 angewandt, sind in Tabelle 3 die Unterschiede im Körpergewicht von 10 Tieren der Gruppen N und M zum Mittelwert der Kontrolltiere gegenübergestellt:

Tabelle 3:

Durchschnittliches Mindergewicht (in g) der mit Nicotin behandelten Tiere (Gruppen N und M) gegenüber den scheinbehandelten Kontrolltieren (Gruppe C; Versuch 1)

Zeitpunkt	Mindergewicht in g $(\bar{x} \pm s_x)$	Signifikanz	
		a)	b)
A 1 d vor Impl.	0,3 $\pm$ 12,2		
B 4 d nach Impl.	25,7 $\pm$ 15,4	$p < 0,01$	-
C 14 d nach Impl.	20,4 $\pm$ 17,1	$p < 0,01$	n.s.

a) Signifikanz gegen A, gepaarter t-Test (9 Freiheitsgrade)

b) Signifikanz gegen B, gepaarter t-Test (9 Freiheitsgrade)

Da der Unterschied zwischen Zeile B und C nicht signifikant ist - der Abstand zur Kontrollgruppe verringert sich ja nur unwesentlich - ist unter den vorgegebenen experimentellen Bedingungen keine Toleranz im Sinne der deskriptiven "set point"-Theorie eingetreten.

Dieser Befund steht im Einklang mit Ergebnissen von Experimenten an männlichen Ratten, die Bättig et al. (1980) durchgeführt haben: Eine Tiergruppe wurde zunächst scheinbehandelt (Basislinie), dann wurde vier Wochen lang täglich Amphetamin gegeben, und schließ-

lich für vier weitere Wochen Nicotin. Eine zweite Gruppe erhielt Nicotin und Amphetamin in umgekehrter Reihenfolge. Die Autoren beschränkten den Zugang der Tiere zum Futter auf vier Stunden täglich und injizierten vor und nach dieser Phase 0,4 mg/kg Nicotin, 1,5 mg/kg DL-Amphetamin oder 0,15 M Kochsalzlösung subcutan. Die mit Nicotin behandelten Tiere erreichten im Gegensatz zu der rascher einsetzenden Wirkung des klassischen Anorektikums Amphetamin erst nach einer Woche den maximalen Abstand zum Körpergewicht der Kontrollgruppe und behielten diesen dann während der drei noch verbleibenden Behandlungswochen bei.

Wegen der fehlenden Toleranzentwicklung gegenüber Nicotin - die bei Amphetamin sehr wohl eintrat - schreiben Bättig et al. den beiden Stoffen einen unterschiedlichen Mechanismus für die Wirkung auf das ingestive Verhalten zu. Die von den mit Nicotin behandelten Ratten aufgenommene Futtermenge war zunächst reduziert, stabilisierte sich aber später auf den Wert vor Versuchsbeginn und blieb dort bis zur "Umschaltung" auf Amphetamin.

Ohne die Futteraufnahme zeitlich zu beschränken, injizierten Schechter u. Cook (1976) weiblichen Ratten fünf Wochen lang in achtstündigem Rhythmus jeweils 0,8 mg/kg Nicotin intraperitoneal. Die Tiere verloren zwar erheblich an Gewicht, die Nahrungsaufnahme war jedoch nicht signifikant verändert. Dem Schluß der Autoren, Nicotin führe zu Gewichtsverlust, ohne die Nahrungsaufnahme zu beeinflussen, widersprachen Bättig et al. (1980): Durch die nur wöchentlich vorgenommene Messung des Futterverbrauchs könnten sub-

tile Änderungen der Beobachtung entgangen sein. Der Versuch von Schechter u. Cook, die Nicotinbedingte Gewichtsabnahme durch die gleichzeitige Gabe der Ganglienblocker und Nicotinantagonisten Hexamethonium und Mecamylamin zu verhindern, führte nicht zu signifikanten Resultaten. Nur beim Hexamethonium zeigte sich immerhin eine Tendenz, in dem beabsichtigten Sinne zu wirken. Die Autoren glauben, daß der gewichtsmindernde Effekt nicht durch solche Nicotinrezeptoren vermittelt wird, die durch die beiden Antagonisten normalerweise blockiert werden.

Da bei der Diskussion der "set point"-Theorie eine kompensatorische Hyper- oder Hypophagie der Ratten als Antwort auf Beeinflussungen des Körpergewichts von außen angenommen werden muß, würden die hier dargestellten Versuche ohne Bestimmung der täglich aufgenommenen Nahrungsmenge unvollständig bleiben. Um einerseits auch kleine tägliche Schwankungen der Futteraufnahme zu erfassen, andererseits aber den Tieren 24 h täglich Nahrung zu bieten, um ein normales Freßverhalten zu garantieren, müssen geeignete Behälter für das angebotene gemahlene Standardfutter zur Verfügung stehen. Für die im folgenden dargestellten Meßergebnisse wurde die Futteraufnahme mit Hilfe des von Fallon (1965) beschriebenen "eatometers" bestimmt. Genauere Informationen hierzu sind den Versuchsberichten (Abschnitt 8) zu entnehmen. Neben der Messung des Wasserverbrauchs, der vor allem für kurzfristige Gewichtsschwankungen von Bedeutung sein kann, wurden die Bedingungen bei den späteren Versuchen außerdem noch insofern abgewandelt, daß statt männlicher weibliche Tiere wegen ihrer im ausgewachsenen Zustand geringeren Gewichtszunahme verwandt wurden.

Die in Abbildung 23 dargestellten Versuchsergebnisse zeigen deutlich, daß Nicotin die Nahrungsaufnahme tatsächlich vermindert. Nach fast vollständigem Appetitverlust während der ersten Tage erreicht der tägliche Futterkonsum jedoch noch unter der Behandlung wieder normale Werte. Der Entzug (Explantation des NAS) löst unmittelbar eine kompensatorische Hyperphagie aus, die - schwächer werdend - mindestens eine Woche lang anhält.

Aus der untersten Graphik in Abbildung 23 ist der Trinkwasserverbrauch ersichtlich, der einen ähnlichen Verlauf nimmt wie die Nahrungsaufnahme. Die Frage, ob Nicotin primär nur die Trinkmengen vermindert, so daß die Tiere ihre normale Ration Trockenfutter nicht mehr aufschließen können und (allein) deswegen weniger Futter aufnehmen - oder ob Nicotin wirklich anorexigen wirkt, ist Gegenstand des Kapitels über den Wasserhaushalt.

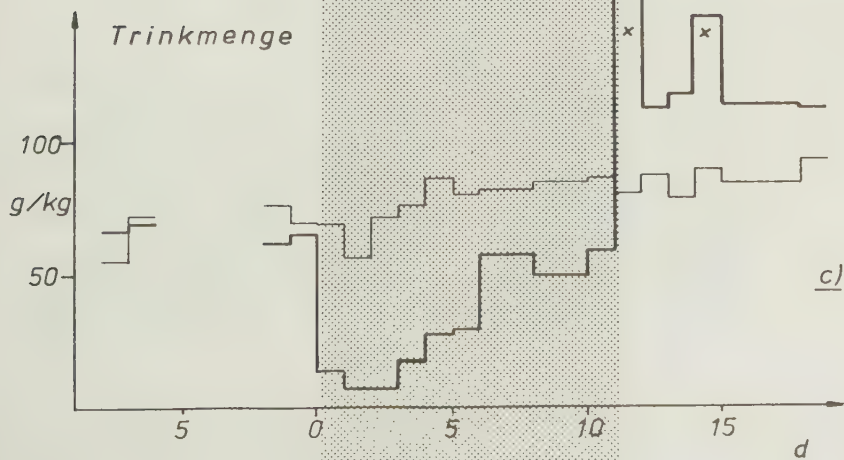
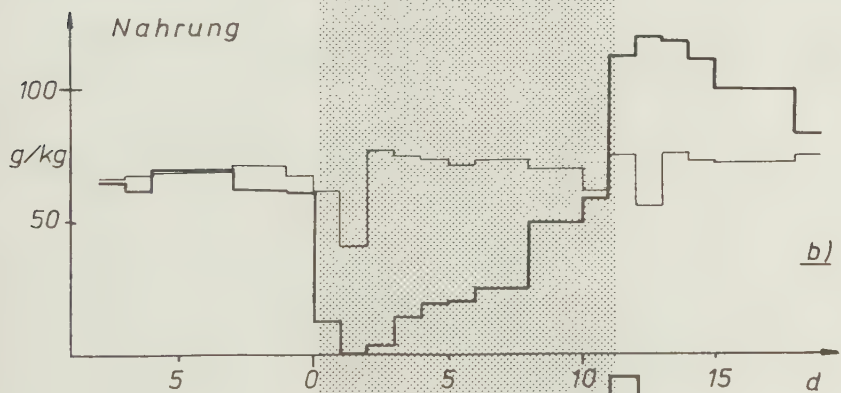
Abbildung 23: Entwicklung von Körpergewicht, Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme während kontinuierlicher Nicotinzufuhr

Der Behandlungszeitraum ist durch die Rasterfläche kenntlich gemacht. Auf der Abszisse ist die seit dem Tag der Implantation vergangene Zeit aufgetragen. (Daten von Versuch 2)

Kräftige Linie: Gruppe N, $n = 5$, Zufuhr rate $0,97 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ Nicotin (Standardabweichung $0,17 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

Dünne Linie: Gruppe C, $n = 5$, scheinoperiert.

Für alle Tiere bestand stets freier Zugang zu Futter und Wasser. An den mit "x" gekennzeichneten Tagen wurde beiden Gruppen zusätzlich 0,1%-ige Saccharinlösung angeboten; die hiervon aufgenommene Menge wurde zur Trinkmenge hinzugerechnet.



Das Ergebnis des Tierversuchs 2 bestätigt zwar die Erfahrung, daß Nicotin (Rauchen) beim Menschen den Appetit mindert und - in dieser Hinsicht ohne merkliche Toleranzentwicklung - das Körpergewicht über Jahre auf einem niedrigeren Niveau hält; es läßt jedoch die Frage offen, ob die nach dem Entzug des Alkaloides eintretende Gewichtszunahme lediglich die Folge einer Kompensation der vorausgegangenen nicotinbedingten Nahrungsbeschränkung ist oder - wie oft behauptet - Ausdruck einer Stoffwechseländerung.

Die experimentelle Klärung dieser wichtigen Frage erfordert eine zusätzliche Abwandlung der Versuchsbedingungen.

Nahrungsentzug oder -restriktion über etwa eine Woche löst bei weiblichen Ratten nach einem Gewichtsverlust von 25% des ursprünglichen Gewichts eine kompensatorische Hyperphagie aus, die anhält, bis nach etwa 15 Tagen das vorherige Körpergewicht wieder erreicht wird (Penicaud u. Le Magnen 1980). Die einem solchen strapaziösen Versuchsschema unterworfenen Tiere erreichen jedoch nicht mehr das inzwischen viel höhere Durchschnittsgewicht vorher gleichschwerer Kontrolltiere, denen stets Futter und Wasser in unbegrenzter Menge zur Verfügung stand.

Um solche, durch das erzwungene Fasten an sich bedingte, Einflüsse auszugleichen, sollten die Tiere der Kontrollgruppe nicht nur, wie bei den bisher beschriebenen Versuchen, in gleicher Weise der Im- und Explantationsprozedur unterworfen werden, sondern auch die gleiche geringe Futtermenge aufnehmen wie die Nicotiningruppe, das heißt sie sollten genauso behandelt werden wie die Versuchstiere, mit dem einzigen Unter-

schied, daß kein Nicotin zugeführt wird.

Das sogenannte "pair-feeding" ist eine solche Methode, welche die Nahrungsaufnahme von Kontroll- und Versuchstieren trotz unterschiedlicher Behandlung einander angleicht (siehe hierzu zum Beispiel Gimenez u. Johnson 1981). Das Konzept setzt zunächst eine Einteilung der Ratten in annähernd gewichtsgleiche Paare voraus, von denen je ein Partner der Kontrollgruppe, der andere der Experimentalgruppe zugeordnet ist. Außerdem werden alle experimentellen Handlungen des Experimentators, die an den Versuchstieren vorgenommen werden, nicht gleichzeitig, sondern erst genau 24 h später auch an den Kontrollratten ausgeführt. Das Wesentliche besteht nun darin, daß jedes Kontrolltier eines gewichtsgleichen Paares exakt die Futtermenge in das "eatometer" °) eingewogen bekommt, die sein Nicotin-Partner in den 24 Stunden davor bei unbeschränktem Angebot konsumiert hat.

Bei der Darstellung der Ergebnisse wurde die Zeitverschiebung um 24 Stunden wieder rückgängig gemacht, damit der direkte Vergleich der beiden Gruppen möglich ist. Das "pair-feeding" wurde nur bis zur Explantation der im Fall der Kontrolltiere leeren NAS fortgeführt; von da an hatten alle Tiere wieder unbegrenzt Futter zur Verfügung. Ein Unterschied in der Futteraufnahme der beiden Gruppen während der Nachperiode würde also direkt auf eine Stoffwechsel-

°): Für die Kontrolltiere bei "pair-fed"-Versuchen wurde der Einsatz des "eatometers" durch eine nahezu halbkugelige Glasschale ersetzt, damit die Futterration auch restlos aufgenommen werden konnte.

wirkung des Nicotins hindeuten; sie kann nicht durch bloße Futterrestriktion verursacht worden sein, denn die Kontrolltiere waren ja vor der Explantation der leeren NAS der gleichen Nahrungsbeschränkung unterworfen wie die mit Nicotin behandelten Versuchstiere.

Abbildungung 24 gibt die Resultate von Versuch Nr.4 wieder. Hier ist bei den behandelten Ratten ein signifikanter Mehrverbrauch an Futter in der Nachperiode festzustellen; noch deutlicher ist die über den Kontrollwert erhöhte Wasseraufnahme. Doch auch während des "pair-fed"-Zeitraumes sind Unterschiede sichtbar: Trotz gleicher 24-Stunden-Futterraufnahme und sogar eher höherer Wasseraufnahme fällt das Körpergewicht der Kontrolltiere auf ein niedrigeres Niveau ab als das der Nicotin-behandelten Ratten. Freilich gleicht

Abbildungung 24: Körpergewicht, Nahrungs- und Trinkwasseraufnahme bei einem "pair-fed"-Experiment

Durch eine Rasterfläche ist der Zeitraum der Nicotin-Behandlung symbolisiert. Auf der Abszisse ist die seit dem Tag der Implantation vergangene Zeit aufgetragen. (Daten von Versuch 4)

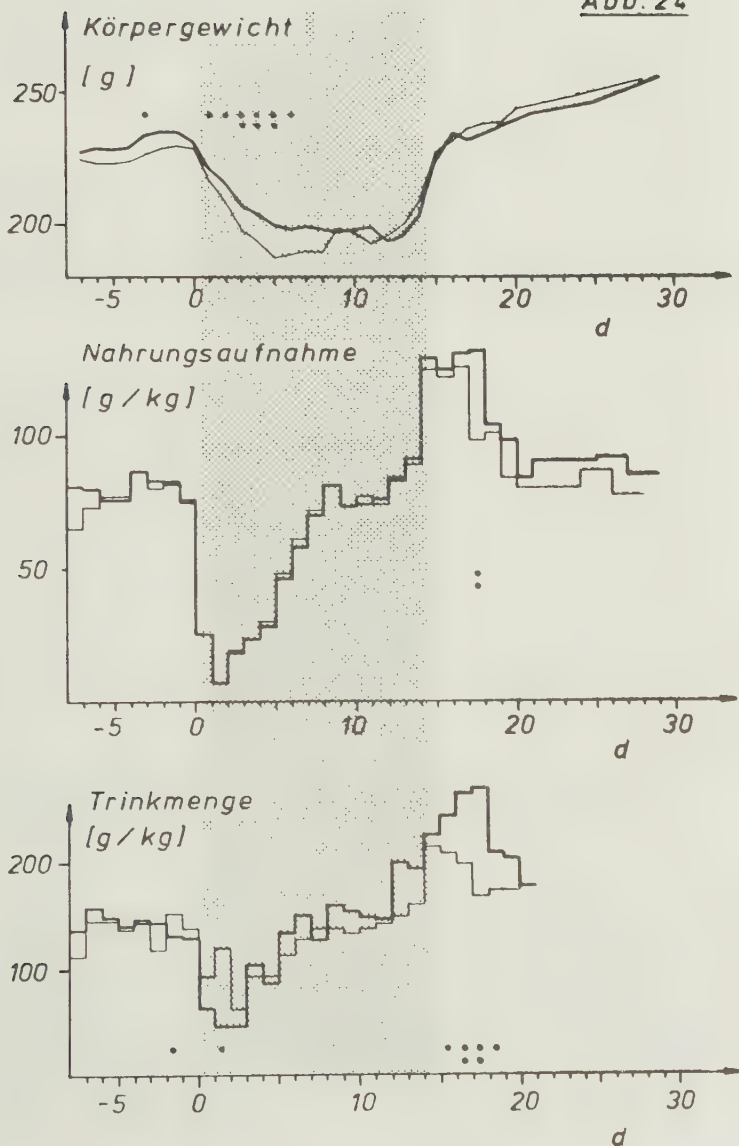
Kräftige Linie: Gruppe N, $n = 5$, Zufuhr rate $1,37 \pm 0,12$
 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung).

Dünne Linie: Gruppe P, $n = 5$, scheinoperiert; den Tieren wurde bis zur Explantation die Nahrung nach dem "pair fed"-Schema zugemessen.

Die für den 7. Tag vor bis 20. Tag nach Implantation eingezeichneten Ergebnisse des Mann-Whitney-Wilcoxon-Tests bedeuten:

• - $p \leq 0,05$; : - $p \leq 0,01$; sonst: nicht signifikant.

Abb. 24



sich dieser Unterschied bereits fünf Tage vor der Explantation aus; in der Nachperiode sind nur noch geringe - statistisch nicht gesicherte - Unterschiede vorhanden.

Erfolgte die Nicotinzufuhr nur eine Woche lang (Versuch Nr. 6, Abbildung 25), so verlief die Nahrungsaufnahme der "pair-fed"-Kontrollen nach Explantation biphasisch: Zunächst nahmen sie signifikant mehr, dann wieder weniger Futter auf als die behandelten Ratten.

Es wird empfohlen, bei "pair-feeding"-Experimenten die Dosis der anorexigenen Substanz so zu wählen, daß der Rückgang der Nahrungsaufnahme unter 50% bleibt, sonst vertilgen die paargefütterten Kontrolltiere die ihnen täglich zugemessenen "Hungerrationen" in kürzester Zeit und sind über den Rest des Tages ganz ohne Nahrung. Aus diesem Grunde wurde das NAS mit einem schlechter diffusiblen Polymerschlauch (Tri-fluorpropylmethylpolysiloxan) versehen, um eine niedrigere Abgaberate zu erreichen. Obwohl sich das Material vom technologischen Standpunkt aus *à la longue* als inkompatibel erwies - es wurde mit der Zeit vom Nicotin angelöst - war es doch mit seiner zunächst sehr niedrigen, dann ständig steigenden Abgaberate geeignet, die Futteraufnahme nur um einen kleinen Prozentsatz, dafür aber über längere Zeit, zu verringern.

Die Ergebnisse dieses Versuches Nr. 8, dargestellt in Abbildung 26 und Tabelle 4, bestätigen - mit quantitativ geringerem Effekt - die Resultate der beiden vorangegangenen "pair-fed"-Experimente mit der größeren Nicotinzufuhr. Die Körpergewichtskurven der Tiere in den Gruppen N und P haben nach der Explantation einen

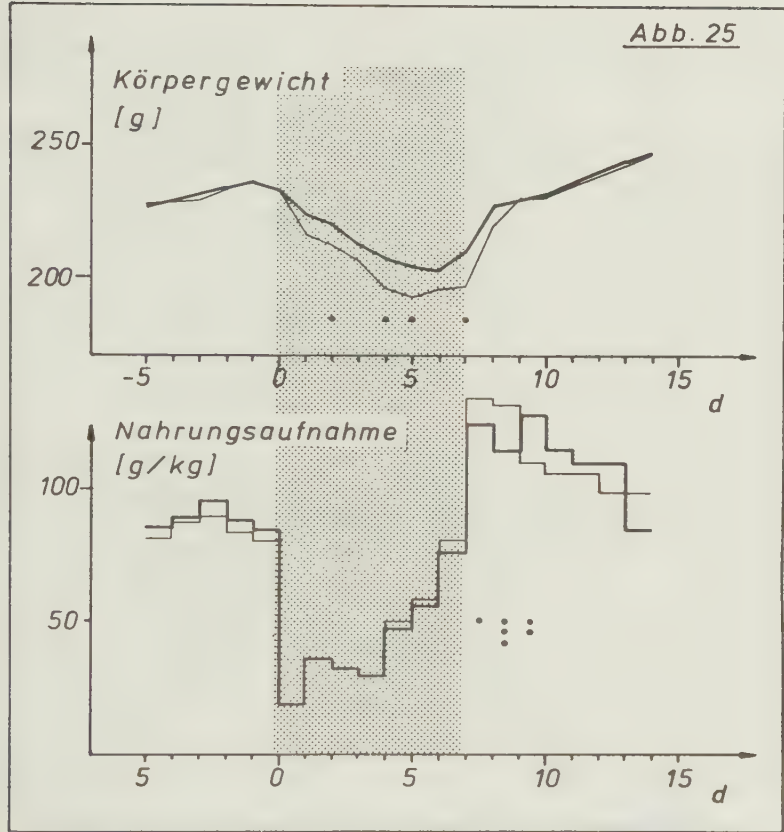


Abbildung 25: Körpergewicht und Nahrungsaufnahme bei Versuch 6

Abszisse: Zeit seit der Implantation in Tagen

Die Behandlungsphase ist durch den Raster wiedergegeben.

Kräftige Linie: Gruppe N, $n = 10$, Zufuhr rate $0,53 \pm 0,08 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
Nicotin (Mittelwert + Standardabweichung)

Dünne Linie: Gruppe P, $n = 10$, scheinoperiert, "pair-feeding"

Ergebnisse des Mann-Whitney-Wilcoxon-Tests:

• - $p \leq 0,05$; •• - $p \leq 0,01$; ••• - $p \leq 0,001$;

sonst: nicht signifikant

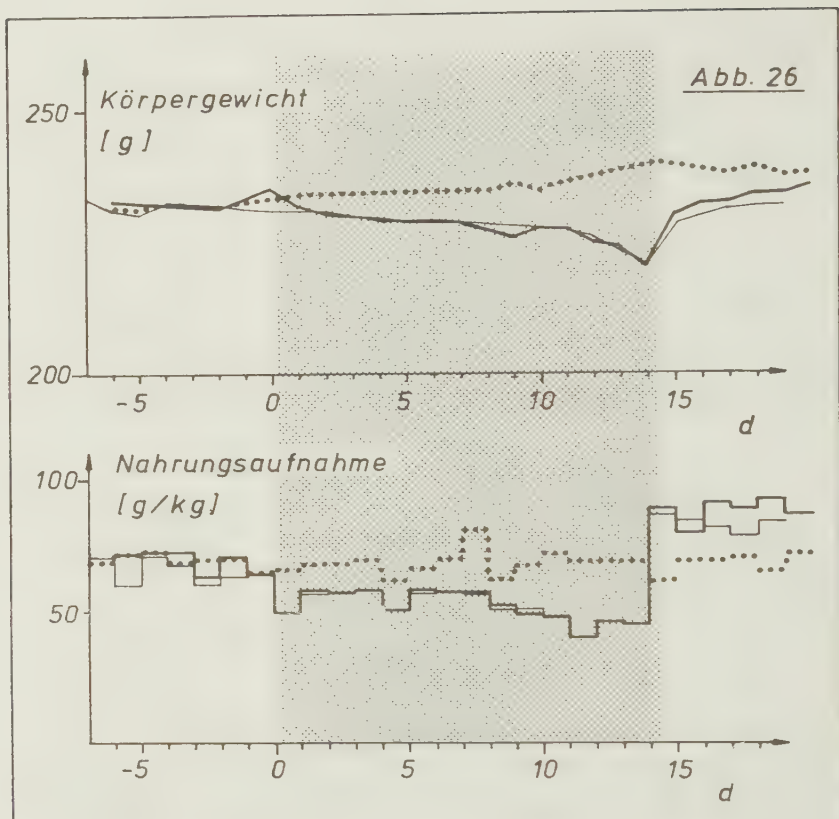


Abbildung 26: Verlauf des Körpergewichts und der Nahrungs-
aufnahme bei ansteigender Nicotinzufuhr

Abszisse: Zeit seit der Implantation in Tagen

Die Rasterung kennzeichnet den Behandlungszeitraum.

Kräftige Linie: Gruppe N, n = 5, Zufuhr rate von anfänglich $0,13 \pm 0,03$ bis auf etwa $0,53 \pm 0,11 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ansteigend (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung; siehe Versuch 8, Abschnitt 8)

Dünne Linie: Gruppe P, n = 5, scheinbehandelt und bis zur Explantation dem "pair-feeding" unterworfen

Punktlinie: Gruppe C, n = 5, scheinbehandelte Kontrollgruppe, stets mit freiem Zugang zu Futter und Trinkwasser

Tabelle 4:

Futtermittelverbrauch (absolut in g, für jede Tiergruppe Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) der Nicotin-Gruppe (N, n = 5), der "pair-fed"-Gruppe (P, n = 5) und der scheinbehandelten Kontrollgruppe (C, n = 5) während der drei Phasen des Versuchs: Vorperiode, Behandlungsperiode und Nachperiode:

Gruppe	Vorperiode (6 Tage)	Behandlung (14 Tage)	Nachperiode (7 Tage)
C	127,2 $\pm$ 6,2	236,9 $\pm$ 7,6	128,6 $\pm$ 8,6
P	117,1 $\pm$ 7,9	166,8 $\pm$ 32,9	143,9 $\pm$ 10,5
N	125,9 $\pm$ 9,9	166,8 $\pm$ 32,9	157,6 $\pm$ 18,4

Signifikanz (unabhängiger t-Test für Gruppe N):

gegen C:	n.s. °)	p < 0,001	p < 0,05
gegen P:	n.s.	n.s.	n.s.

°): nicht signifikant

nahezu parallelen Verlauf. Auch in der Futtermittelaufnahme ist in der Tendenz das gleiche feststellbar, was bei Versuch Nr.6 (Abbildung 25) statistisch abgesichert wurde: Am dritten bis fünften Tag nach dem Entzug wird von den "pair-fed"-Ratten etwas mehr Nahrung aufgenommen, am ersten und zweiten Tag ist es eher umgekehrt.

Das "pair-feeding" hat sich zwar als elegante Methode erwiesen, um die Grundbedingungen für behandelte und unbehandelte Tiere gleich zu halten, doch müssen einige Besonderheiten beachtet werden. Zu Beginn eines jeden

"pair-fed"-Experimentes kommt es vor, daß einige Kontrolltiere die ihnen "zustehende" Ration nicht restlos aufzehren (bei der Bestimmung des Futterkonsums in den vorstehend beschriebenen Versuchen wurde ein solcher Rest von der eingewogenen Menge wieder subtrahiert!).

Dieses Defizit kann nicht wieder aufgeholt werden, denn die Futterreste werden nicht im Behälter gelassen, sondern verworfen, sonst würde die Futterration des folgenden Tages künstlich erhöht. Erst wenn die Tiere nach einigen Tagen ein geringes Mindergewicht und damit einen ausreichenden Appetit entwickelt haben, verzehren sie die ihnen zugemessene Futtermenge vollständig. Auf die bei stark reduzierter Futtermenge erkennbare Neigung, die ganze Ration auf einmal zu vertilgen, statt sie über den Tag zu verteilen, wurde schon einmal hingewiesen.

Eine weitere Ungenauigkeit ist durch die 24-stündige Zeitverschiebung bedingt. Während zeitgleich mitgeführte Kontrolltiere von den Umwelteinflüssen des Tages (Licht, Geräusche) - soweit sie im Tierlabor überhaupt noch wahrnehmbar sind - in demselben Maße wie die behandelten Tiere betroffen sind, wirken auf die "pair-fed"-Tiere am nächsten Tag schon wieder andere Reize ein. Bei der Auswertung könnten daher kurzfristig auftretende Unterschiede erkennbar werden, die nicht durch planmäßige Behandlungseinflüsse herbeigeführt worden sind. Der Kurvenverlauf der in Versuch Nr. 8 hinzugezogenen Kontrollgruppe (Abbildung 26) zeigt aber, daß diese Befürchtungen hier unnötig waren.

Bei den vorher mit Nicotin behandelten Tieren läuft die gesteigerte Nahrungsaufnahme nach Entzug des Alkaloids zwar offenbar nach einem anderen zeitlichen Muster ab als bei den Kontrolltieren, denen bis zur Beendigung der Scheinbehandlung nicht mehr und nicht weniger Nahrung zur Verfügung gestanden hat; es gibt aber keinen Hinweis darauf, daß der Nicotinentzug bei behandelten Ratten insgesamt zu einem stärkeren Gewichtszuwachs als bei "pair-fed"-Tieren führt.

Aufgrund solcher Befunde läßt sich also die Hyperphagie nach Nicotinentzug schon mit kompensatorischem ingestiven Verhalten allein erklären, obgleich dieser Schluß nicht ohne weiteres über den Rahmen dieser Experimente hinaus zu verallgemeinern ist.

6.2 Einfluß auf die Trinkwasseraufnahme

Als Ursache für Körpergewichtsänderungen kommt auch eine Zunahme oder Verminderung der täglich aufgenommenen Trinkwassermenge in Betracht. Die Erfahrung lehrt, daß auf diese Weise sogar viel rascher eine Beeinflussung des Gewichts möglich ist; ein Mensch kann sein Körpergewicht durch starkes Trinken binnen einer halben Stunde leicht um ein Kilogramm erhöhen. Dagegen dürfte die Trinkmenge keinen großen Einfluß auf langfristige Änderungen des Gewichtsniveaus haben, weil das Körperwasser aufgrund von Autoregulationsmechanismen in einem gleichbleibenden Verhältnis zur Trockenmasse des Organismus steht.

Betrachtet man noch einmal Abbildung 23, dann erkennt man, daß die tägliche Flüssigkeitsaufnahme der unter

dem ständigen Einfluß von Nicotin stehenden Tiere ebenso stark vermindert war wie die Nahrungsaufnahme. Der parallele Verlauf der Kurven in Abbildung 23 b) und c) (Nicotin-Gruppe) läßt eine Querverbindung zwischen diesen beiden Erscheinungen vermuten.

Eine solche Vermutung ist darin begründet, daß den Tieren ja kein natürliches Feuchtfutter angeboten wird, sondern sogenanntes Standardfutter, das heißt, eine fabrikmäßig hergestellte, gemahlene Trockendiät, die nur durch zusätzliches Wassertrinken aufgeschlossen werden kann. Münster u. Bättig (1975) bezeichnen dieses ingestive Verhalten als "prandial drinking", glauben aber nicht, daß es für die nach Nicotinzufuhr zu beobachtende Verminderung der Trinkmenge (allein) verantwortlich ist.

Ein unmittelbarer Hinweis auf eine direkte Wirkung des Nicotins auf die Flüssigkeitsaufnahme gelang den Autoren mit Hilfe der Methodik der elektrischen Reizung des "Durstzentrums" im Hypothalamus. Dem Versuchstier wurde lediglich Wasser (kein Futter) angeboten, und es wurde die nötige Stärke des Stimulationsreizes ermittelt, die sofortiges Trinken auslöst. Nach vorheriger Injektion von 0,45 mg/kg Nicotin wurde eine signifikante Erhöhung der Reizschwelle gemessen, die bei gleichzeitiger Gabe des zentral wirksamen Ganglienblockers und Nicotinantagonisten Mecamylamin ausblieb; der nicht schrankengängige Ganglienblocker Hexamethonium war in diesem Falle wirkungslos.

Auch die unter kontinuierlicher Nicotineinwirkung stehenden Ratten der eigenen Experimente lassen - das ist aus Abbildung 24 ersichtlich - im Vergleich

mit paargefütterten Kontrolltieren eine signifikante hypodiptische Wirkung erkennen. Da die von den Tieren der beiden Gruppen aufgenommenen Futtermengen nahezu identisch sind, kann das von den "pair-fed"-Tieren aufgenommene Wasser als Maß für die prandiale Trinkmenge dienen. Bezeichnenderweise war die Polydipsie nach dem Nicotinentzug viel stärker ausgeprägt als die durch die kompensatorische Hyperphagie notwendig gewordene vermehrte Flüssigkeitsaufnahme bei den "pair-fed"-Tieren (siehe Abbildung 24).

Die Schlußfolgerung aus diesen mit den in der Literatur mitgeteilten Erfahrungen übereinstimmenden Resultaten ist, daß Nicotin während kontinuierlicher Zufuhr eine Hypodipsie auslöst, die mit Sicherheit auf einer direkten Wirkung beruht, zum Teil allerdings auch eine Folge der Verminderung des Futterkonsums ist.

Theoretisch besteht natürlich auch die umgekehrte Möglichkeit, daß nämlich der Minderkonsum an Nahrung eine Folge der Verminderung der Trinkmengen ist, ohne daß eine echte Anorexie vorläge; ein solcher Kausalzusammenhang ist aber unwahrscheinlich. Das zeigen experimentelle Ergebnisse anderer Autoren und auch eigene Befunde.

So war der Einfluß auf die Nahrungsaufnahme (Averett 1962) und auf das Körpergewicht (Náquira u. Arqueros 1978) bereits bei Nicotindosen signifikant, die noch keine Reduktion der Trinkmengen zur Folge hatten. Auch wir fanden, daß die körpergewichtssenkende Wirkung bereits bei kleineren Dosen einsetzt als die hypo-

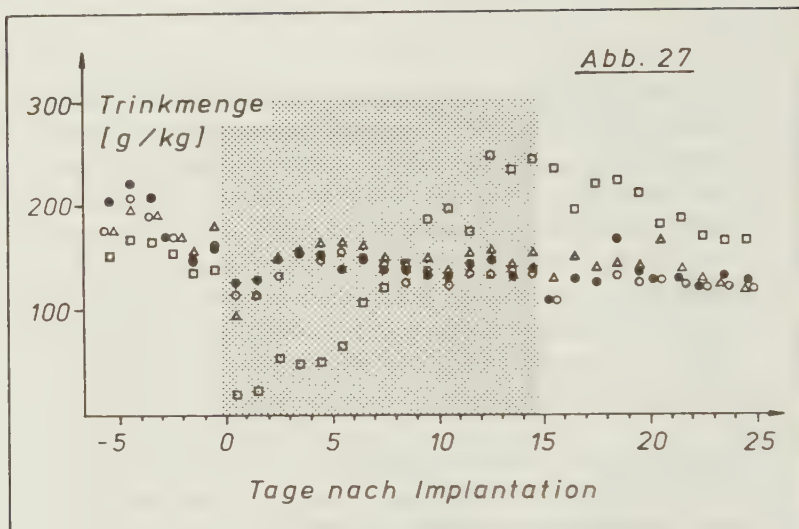


Abbildung 27: Tagestrinkmenge bei Versuch 1

Der Zeitraum kontinuierlicher Nicotinzufuhr ist durch eine Rasterfläche symbolisiert. Während des Versuchs hatten alle Tiere (männliche Ratten) freien Zugang zu Wasser und Nahrung. Die Vierecke, Dreiecke und Kreise repräsentieren den Mittelwert für die tägliche Trinkmenge einer jeden Gruppe. Die zugehörige Gewichtskurve findet sich in Abbildung 21. Die folgenden Zahlenangaben betreffen Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen der Nicotin-Zufuhr rate:

- Gruppe C: $n = 8$ (ab 17. Tag $n = 6$); Scheinbehandlung
- Gruppe N: $n = 6$; $0,25 \pm 0,04 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
- △ Gruppe M: $n = 4$; $0,73 \pm 0,14 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
- Gruppe H: $n = 2$; $1,65 \pm 0,21 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

diptische Wirkung (siehe Abbildungen 21 und 27; Versuch Nr. 1). Münster u. Bättig (1975) haben ebenfalls gezeigt, daß Nicotin direkt anorexigen wirkt. Mit Hilfe der elektrischen Stimulation des hypothalamischen Hungerzentrums ermittelten sie die Reizstärke, die bei gesättigten Ratten Nahrungsaufnahme auslöst, und registrierten nach Injektion von Nicotin eine Erhöhung der Reizschwelle.

Abbildung 27 ist auch zu entnehmen, daß der akute (innerhalb der ersten Tage nach Implantation erkennbare) hypodiptische Effekt von Nicotin dosisabhängig zunimmt; langfristig bildet sich eine - bereits vor der Explantation deutliche - dosisabhängige Polydipsie aus.

Die Hemmung der Wasseraufnahme ist, wie aus Abbildung 24 ersichtlich, der Toleranzentwicklung unterworfen; am zweiten Tag nach der Implantation trinken die Nicotin-Tiere signifikant weniger, dann verliert sich dieser Unterschied zur Vorperiode. Man kann einwenden, es könne sich hier, wie bei der wieder ansteigenden Futteraufnahme unter fortdauernder Nicotineinwirkung, um einen kompensatorischen Mechanismus handeln; die Zunahme der Trinkmengen wäre dann lediglich Folge des immer stärker werdenden Wasserbedarfs und - indirekt - des wieder zunehmenden Futterkonsums. Dieser Einwand ist aber wenig stichhaltig, da es sich bei der Kontrollgruppe hier um "pair-fed"-Tiere handelt.

Bei der Frage nach der Ursache für die Reduktion der Trinkmenge ist man versucht, von einer Durstminderung zu sprechen, doch die Erfahrungen von Rauchern geben hier - im Gegensatz zur häufig bestätigten Appetithemmung - kein einheitliches Bild (Lickint 1939).

Münster u. Bättig (1975) bieten mit Vorsicht die durch Nicotin induzierte Freisetzung von ADH (antidiuretischem Hormon) als Wirkungskomponente an, obgleich eine direkte Wechselwirkung zwischen der ADH-Antidiurese und der Durstreaktion noch nicht nachgewiesen worden ist. Andererseits erscheint es denkbar, daß Nicotin auf hypothalamische Zentren einwirkt, die sowohl die ADH-Ausschüttung als auch die Dursthemmung - das emotionale Korrelat einer (hier nur vorgetäuschten) "Überwässerung" des Körpers - veranlassen.

Die Diuresehemmung durch Nicotin verdient wegen des Zusammenhangs mit der Beeinflussung der Trinkmenge unser Interesse. Burn et al. (1945) injizierten Ratten 0,25 mg Nicotin pro Tier subcutan und beobachteten eine vorübergehende Diuresehemmung. Beim Menschen reichten zur meßbaren Herabsetzung der Harnausscheidung 0,5 mg Nicotin oder drei schnell hintereinander gerauchte Zigaretten aus (siehe auch Kreuziger, Heinecker u. Kemper 1955). Burn et al. (1945) fanden an hypophysektomierten Ratten keine antidiuretische Wirkung mehr und folgerten daraus, daß Nicotin die ADH-Sekretion stimuliert.

Eine wichtige Konsequenz dieser Erkenntnis ist, daß Menschen und Tiere mit gestörter oder fehlender Funktion der hypothalamo-hypophysären Osmoregulation nicht mit einer adäquaten Antidiurese auf eine probatorische Nicotingabe reagieren. Lewis u. Chalmers (1951) führten an elf Patienten mit einer starken Polyurie den sogenannten Nicotintest durch: Messung der Harnausscheidung nach Rauchen von bis zu drei Zigaretten. Auf diese Weise konnten sie in acht Fällen das Vorliegen eines

ADH-bedingten Diabetes insipidus differentialdiagnostisch abklären.

Die nach intravenöser Injektion von 1 bis 2 mg Nicotin beim Menschen gemessene ADH-Konzentration im Blutplasma erreichte 2 bis 15 min später ein Maximum von 21,3 μ I.E./ml und fiel nach 60 min wieder auf den Normalwert von 5,2 μ I.E./ml ab (Conte-Devolx et al. 1976).

Für Untersuchungen über die Rolle des antidiuretischen Hormons erwies sich eine Ratten-Mutante mit hereditär fixiertem Diabetes insipidus - der Brattleboro-Stamm - als wertvoll. Diese Tiere sind unempfindlich gegenüber der antidiuretischen Wirkung von Nicotin; es kommt nicht zur Ausschüttung von ADH, wohl aber wird das ebenfalls aus der Neurohypophyse stammende Hormon Oxytocin im Harn vermehrt gefunden (Jones u. Lee 1967).

Supek u. Eisen (1953) versuchten vergeblich, die Nicotin-bedingte Antidiurese mit verschiedenen neuronal angreifenden Substanzen (Atropin, Tetraethylammonium, Diparcol, Parpanit, Pentamethonium und Procain) zu beeinflussen, hatten aber nur mit großen Dosen Phenobarbital (Wirkungsabschwächung) und mit Urethan (Wirkungssteigerung) Erfolg. Dagegen zeigte sich Mecamylamin als wirksamer Antagonist der Nicotin-Antidiurese bei der mit Ethanol narkotisierten Ratte (Mansner u. Mattila 1975). Die Tatsache, daß Mecamylamin sowohl die durch Nicotin bewirkte Hypodipsie als auch die Nicotin-bedingte Diuresehemmung antagonisiert, ist ein weiteres Argument für einen beiden Wirkungen gemeinsamen zentralen Mechanismus.

7. Toleranzentwicklung bei ständiger Nicotinzufuhr

Bevor die Frage der Gewöhnung an Tabak und Nicotin behandelt wird, ist eine Klärung der üblichen Begriffe erforderlich.

Toleranzentwicklung bedeutet nach der WHO-Definition, daß eine Erhöhung der Dosis notwendig ist, um einen anfänglichen Effekt aufrechtzuerhalten (Stille u. Coper 1980).

Der Ausdruck Toleranz wird häufig auch gleichbedeutend mit "individueller (Un-) Empfindlichkeit" gebraucht, zum Beispiel "Salztoleranz" (halophiler Pflanzen) oder "Glucose-Toleranz-Test". Damit man nicht ständig von "erhöhter Toleranz" oder "Toleranzentwicklung" sprechen muß, um die mit der Zeit eintretende Entwicklung einer abgeschwächten Empfindlichkeit zu bezeichnen, soll im folgenden der Ausdruck "Toleranz" synonym mit "Toleranzentwicklung" bzw. "Gewöhnung" gebraucht werden.

Im Hinblick auf die verschiedenen zur Toleranz führenden Mechanismen ist grundsätzlich zwischen dispositioneller und zellulärer Toleranz ("functional tolerance", "true tolerance") zu unterscheiden (Kalant et al. 1971):

Die dispositionelle Toleranz umfaßt Änderungen in Aufnahme, Verteilung, Metabolismus oder Ausscheidung eines Wirkstoffes, die zu einer Verringerung von Intensität und Dauer des Kontaktes zwischen Stoff und Zielorgan (Gewebe, in dem er seine charakteristische Wirkung ausübt) führen.

Änderungen in den Eigenschaften und Funktionen des Zielorgans selbst, die es bei gleicher Dauer und Intensität des Kontakts mit der Wirksubstanz weniger empfindlich für den Stoff machen, bezeichnet man als zelluläre Toleranz.

Die Unterscheidung zwischen diesen beiden Mechanismen, die allerdings häufig gemeinsam auftreten, ist im allgemeinen leicht möglich: Im Falle der dispositionellen Toleranz betrifft der Wirkverlust alle Wirkungen einer Substanz gleichermaßen, bei der zellulären Toleranz sind meist nur einige Wirkqualitäten betroffen (Stille u. Coper 1980).

Das folgende Beispiel verdeutlicht gemäß dieser Unterscheidung eine vorwiegend zelluläre Toleranz: Ein Patient, der seit längerer Zeit mit Morphin behandelt wird, muß weiterhin unter den fast unverminderten vegetativen Begleiterscheinungen (Obstipation u.ä.) leiden, während er sich an die zentrale analgetische Wirkung bereits derart gewöhnt hat, daß die Dosis gesteigert werden muß.

Die meisten, aber durchaus nicht alle abhängigmachenden Stoffe erzeugen beim Menschen Toleranz. Das bekanntermaßen zu starker psychischer Abhängigkeit führende Cocain ruft dagegen beim Menschen weder Toleranz noch körperliche Abhängigkeit hervor. Auch der umgekehrte Schluß, ein Toleranz auslösender Stoff müsse unbedingt zur "Sucht" führen, ist falsch. So kann man sich leicht an die laxierende Wirkung von Abführmitteln gewöhnen, ohne eine psychische Abhängigkeit zu entwickeln.

Daher muß sorgfältig zwischen den voneinander unabhängigen Begriffen Toleranz und Abhängigkeit bzw. Suchtbildung unterschieden werden (siehe dazu Opitz 1973).

Probleme der Meßbarkeit von Toleranz können Gewöhnungserscheinungen vortäuschen, obwohl sie mit diesen ursächlich nichts zu tun haben. Die unter ständigem Einfluß von Nicotin zunächst rasch abnehmende, dann allmählich wieder ansteigende Futteraufnahme der Ratten bei den bereits kommentierten Versuchen war ja nicht Ausdruck einer sich entwickelnden Toleranz, sondern einer Mangelsituation, die unter dem Einfluß von Nicotin entstand, immer stärker wurde, und deshalb ausgeglichen werden mußte.

Da es kaum möglich ist, ein Tier einerseits kontinuierlich mit Nicotin zu behandeln und andererseits sein Körpergewicht und seinen Stoffwechsel jeden Tag auf das anfängliche Niveau zu bringen, mußte die (fehlende) Toleranzentwicklung hilfsweise, wie beschrieben, durch Anwendung des "pair-feeding" demonstriert werden.

Es gibt noch einige andere Beispiele für diese "Toleranz durch Substratmangel", die eine echte Gewöhnung nur vortäuscht. So führt die Langzeitbehandlung mit manchen Diuretika ohne entsprechende Gegenmaßnahmen zu einer zunehmenden Verarmung des Organismus an bestimmten harnpflichtigen Substanzen sowie zu Verschiebungen im Säure-Basen-Haushalt, und die diuretische Wirkung hört allmählich auf. Durch Zufuhr der entsprechenden Substrate - im Falle von Acetazol-

amid KHCO_3 - kann die diuretische Wirksamkeit wiederhergestellt werden. Das Nachlassen des diuretischen Effektes bei wiederholter Verabreichung ist also nicht auf Gewöhnung ("true tolerance") zurückzuführen, sondern lediglich auf den immer stärker werdenden Substratmangel.

- Enzyminduktion durch Nicotin?

Dispositionelle Toleranz ist in der Regel durch Beeinflussung des enzymatischen Abbaus im Organismus bedingt. Einige der in Abbildung 28 grob skizzierten Abbauvorgänge für Nicotin müßten dann nach langdauernder Zufuhr beschleunigt ablaufen. Die Aktivität eines Enzyms kann durch direkte Einwirkung eines Stoffes, zum Beispiel aufgrund eines allosterischen Effektes, verstärkt (Enzymaktivierung), abgeschwächt (Enzymhemmung) oder indirekt durch eine gesteigerte de-novo-Synthese induziert werden: Enzyminduktion.

Der beim Menschen wichtigste Metabolit des Nicotins ist das Cotinin; der Anteil der Metabolisierung schwankt jedoch in weiten Grenzen und hängt von Einflüssen ab, die zum Teil nicht von erhöhter Enzymaktivität herrühren (zum Beispiel von Harnfluß und Harn-pH-Wert).

Abbildung 28: Wichtige Abbauwege des Nicotins im Säugetierstoffwechsel (nach Gorrod u. Jenner 1975)

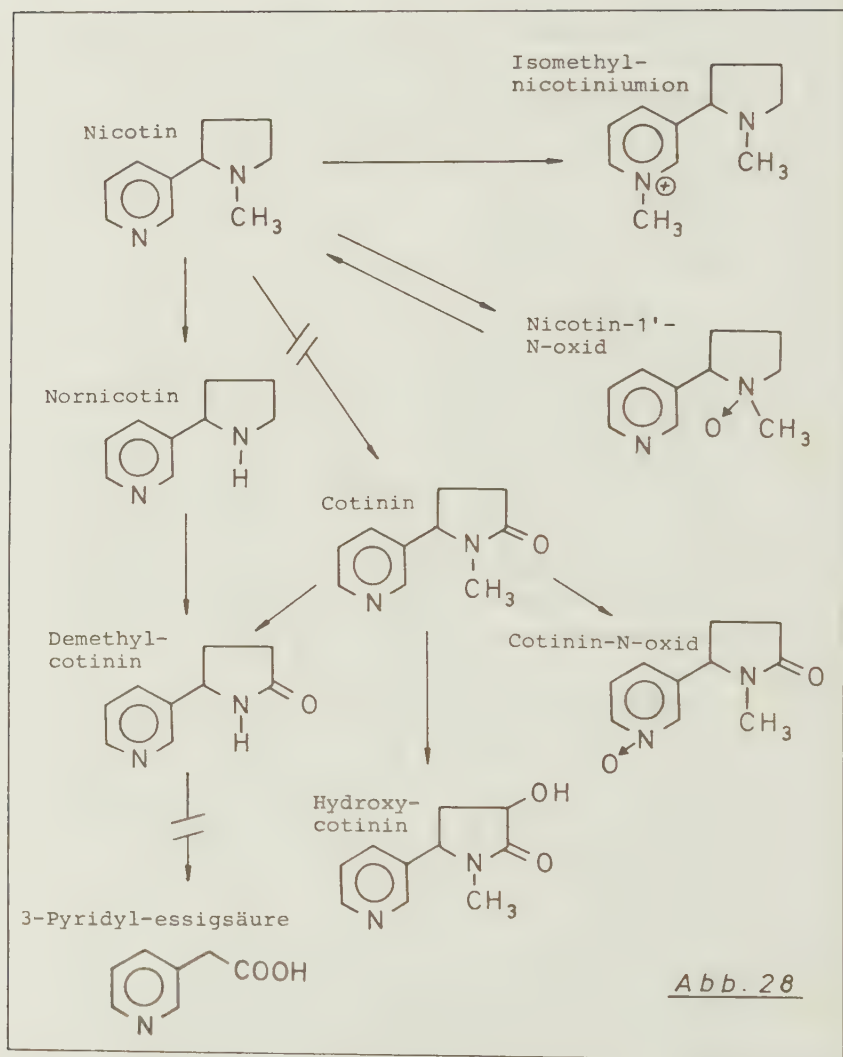


Abb. 28

"—//—": Reaktion läuft über Zwischenstufen ab.

Beckett u. Triggs (1967) untersuchten Raucher und Nichtraucher auf ihre Fähigkeit, Nicotin zu metabolisieren. Es stellte sich heraus, daß der Anteil des wieder unverändert im Urin ausgeschiedenen Nicotins bei Rauchern bedeutend niedriger liegt (25-50%) als bei Nichtrauchern (55-70%).

In einer neueren Arbeit berichten Beckett et al. (1971) über Bestimmungen von Nicotin und Cotinin im Harn von Männern und Frauen, die sowohl Raucher als auch Nichtraucher umfaßten. Die fünf weiblichen Raucher schieden im Mittel 35,9% einer zuvor verabreichten Nicotin-Testinjektion als Nicotin und 26,4% als Cotinin, die vier Nichtraucherinnen 45,4% als Nicotin und weniger als 5% in Form von Cotinin aus. Bei den Männern (Raucher und Nichtraucher) waren die Resultate uneinheitlicher, doch wurde generell ein geringerer Anteil Nicotin ausgeschieden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß fortgesetztes Rauchen den Abbau von Nicotin beschleunigt, aber es bleibt unklar, welcher der über 1000 bekannten Rauchbestandteile (Schmidt 1979) den Nicotinabbau nun beschleunigt.

Die Versuche von Beckett et al. geben keine Antwort auf die Frage, ob Nicotin bei wiederholter oder ständiger Einwirkung seinen eigenen Abbau beschleunigt, denn diese Autoren haben ja Tabakrauch als "Enzyminduktor" verwandt.

Bei den schon länger zurückliegenden Experimenten von Werle u. Uschold (1948) kam dagegen tatsächlich reines Nicotin zum Einsatz. Werle u. Uschold behandelten Ratten mit täglichen Dosen von 5 mg/kg (!) Nicotin und stellten eine allmähliche Abnahme der renalen Ausscheidung von unverändertem Nicotin fest.

Dagegen bemerkten sie keinen großen Unterschied in der Entgiftungsfähigkeit der Leber, so daß sie selbst die Steigerung der Abbaufähigkeit als begrenzt bezeichneten.

Stalhandske u. Slanina (1970) behandelten Mäuse über Zeiträume von 3 bis 17 Tagen mit Nicotindosen, die teils als intraperitoneale Injektionen und teils als Zusatz zum Trinkwasser appliziert wurden. Die Tiere der drei Tage lang behandelten Gruppe zeigten eine hochsignifikante Enzymhemmung (um 50%), während die länger behandelten Mäuse lediglich eine nicht signifikante Tendenz zur Erhöhung der Cotininbildung zeigten.

Auch Westfall u. Brase (1971) sahen keine Änderung der Aktivität der Nicotinoxidase nach drei, acht und 14 Tagen Behandlung (Injektion von 1 mg/kg zweimal täglich bei der Ratte).

Aufgrund dieser Angaben ist es unwahrscheinlich, daß Nicotin seinen eigenen Abbau in nennenswertem Maße stimuliert.

Die in Abschnitt 5 beschriebenen und kommentierten Messungen der Nicotinkonzentration im Blut der Ratten, denen kontinuierlich Nicotin zugeführt wurde, geben auch keinen Hinweis auf größere Änderungen im Nicotinabbau. In Abbildung 29 ist die durchschnittliche Menge Nicotin graphisch dargestellt, die sich nach zwei, acht und zehn Tagen fortlaufender Zufuhr von etwa 0,24 mg Nicotin in der Stunde im Körper einer Ratte befindet. Die Gewichtsänderungen der Tiere, die in Abbildung 20 zum Ausdruck kommen, sind

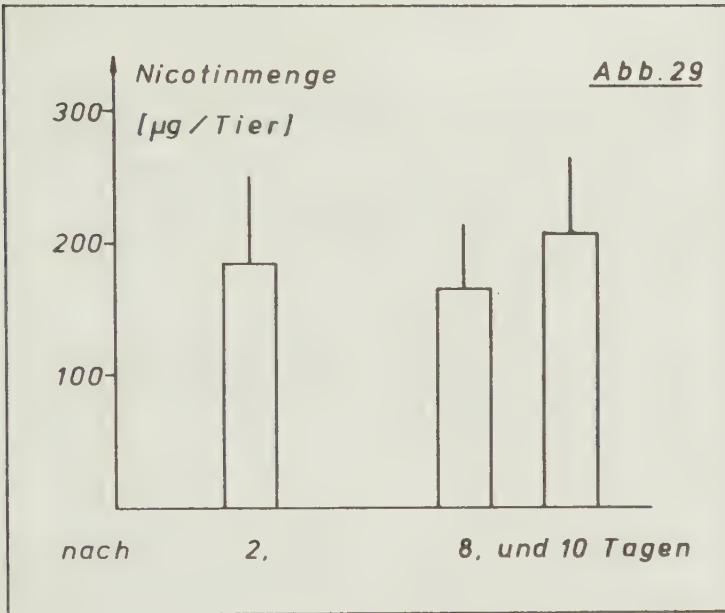


Abbildung 29:

Aus aktuellem Körpergewicht und Blutspiegel berechnete "steady state"-Nicotinmenge im Körper der Ratte

Angenommen wurde für die Berechnung aller Werte ein Verteilungsvolumen von 2,2 l/kg (nach Miller et al. 1977). Die abgebildeten Blöcke betreffen Mittelwerte mit Standardabweichung von 16 Tieren aus Versuch Nr. 3. Die Nicotin-Zufuhrtrate lag bei etwa 0,24 mg/h.

bei dieser Darstellungsweise eliminiert. Die ständig im Fließgleichgewicht des Organismus befindliche Menge von etwa 180 µg Nicotin bleibt also nahezu unverändert, obwohl sie fast zweimal in der Stunde metabolisiert, eliminiert und durch Nachdiffusion aus dem NAS wieder ersetzt wird.

Nicotin beschleunigt seinen eigenen Metabolismus also nicht, aber es kann den Abbau anderer Stoffe offenbar deutlich beeinflussen: Ruddon u. Cohen (1970) wiesen nach, daß Nicotin nach chronischer Zufuhr den Abbau von Ethylmorphin, Norcodein und Anilin in den Mikrosomen der Rattenleber beschleunigt. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Ali et al. (1980). Sowohl chronisch oral zugeführter Tabak als auch Nicotin beschleunigten die N-Demethylierung von Morphin, Pethidin und Amidopyrin bei der Ratte. Auch über gesteigerten Abbau von Meprobamat (Wenzel u. Broadie 1966) und 3,4-Benzpyren (Yamamoto et al. 1966) ist berichtet worden.

Der letztere Induktionseffekt beruht auf Gegenseitigkeit: Das im Tabakrauch vorkommende bekannte Präcancerogen 3,4-Benzpyren verstärkt den Abbau von Nicotin (Yamamoto et al. 1966; Weber et al. 1974). Stalhandske (1970) zeigte an mit Phenobarbital vorbehandelten Mäusen, daß dieser starke Enzyminduktor auch den Abbau von Nicotin fördert; nach intraperitonealer Gabe blieben die Nicotinkonzentrationen im Hirn signifikant niedriger als bei unvorbehandelten Tieren. Die letale Dosis wurde bei intraperitonealer Applikation auf das Zwei- bis Dreifache gesteigert, wohingegen nach intravenöser Zufuhr des schnell wirkenden Giftes keine Unterschiede in der Toxizität

zwischen Tieren mit und ohne induziertem Abbau zu erkennen waren.

Nicotin kann also den Abbau anderer Stoffe fördern und umgekehrt wird auch der Abbau von Nicotin - zum Beispiel durch im Tabak vorkommende polycyclische Kohlenwasserstoffe - verstärkt. Ein erhöhter Abbau von Nicotin beeinflußt die Toxizität allerdings nur dann, wenn die Resorptionszeit lang genug ist, um den beschleunigten Abbau überhaupt zum Tragen kommen zu lassen.

- Nicotin-Toleranz

Nichtraucher sind gegen die Wirkungen von Nicotin und Tabakrauch empfindlicher als Gewohnheitsraucher; das ist eine Tatsache, die dem Laien geläufig ist und die in verschiedenem Zusammenhang auch unter experimentellen Bedingungen immer wieder bestätigt worden ist (Johnston 1942; Rottenstein et al. 1960).

Die zu Anfang dieses Jahrhunderts aufkommenden Berichte über Gewöhnung an Nicotin (Dixon u. Lee 1912; Behrend u. Thienes 1933; Staemmler 1935) waren noch widersprüchlich. Das liegt wohl daran, daß meist die Auswirkungen konvulsiver oder gar letaler Dosen gemessen wurden, gegen die sich - wenn überhaupt - gewöhnlich nur eine sehr schwache Toleranz ausbildet. Dagegen ist heute unbestritten, daß viele Nicotinwirkungen bei wiederholter Verabreichung durch Gewöhnung abgeschwächt werden oder ganz verschwinden.

So wurde in verhaltensphysiologischen Versuchen an Ratten Toleranz beim diskriminativen Verhalten

(Schechter u. Rosecrans 1972), bei der zentralen Erregung durch kleine Dosen (0,03 mg/kg; Hubbard u. Gohd 1975) und auch bei der Aktivitätsminderung durch größere Dosen (bis 1 mg/kg) Nicotin (Stolerman et al. 1974) festgestellt.

Ebenso lassen Nicotin-bedingte Einflüsse auf die Konzentration physiologischer Blutbestandteile eine mit der Zeit nachlassende Wirkungsstärke erkennen. Der nach Nicotingabe erhöhte Glucosespiegel im Blutplasma der Ratte geht unter chronischer Behandlung nach und nach zurück (Classen u. Bättig 1976). Auch die nach Nicotinzufuhr erhöhte Corticosteronkonzentration im Blut der Ratte nimmt infolge von Gewöhnung ab (Benwell u. Balfour 1979; Balfour 1980). Auf diese Weise könnten auch die corticosteronabhängigen Wirkungen abgeschwächt werden.

Nicotin bewirkt im Nebennierenmark und an adrenergen Nervenendigungen eine vermehrte Ausschüttung von Prenzkatechinaminen, die an der erhöhten Konzentration dieser Stoffe im Harn sichtbar wird. Westfall u. Brase (1971) untersuchten, aus welchem Grund auch dieser Effekt der Toleranz unterworfen ist. Dabei wurde dispositionelle Toleranz als Ursache ausgeschlossen, da nach chronischer zweiwöchiger Zufuhr keine Änderung der Nicotinoxidaseaktivität in der Leber der untersuchten Ratten aufgetreten war.

Indessen wurde eine Erhöhung der Enzymaktivität der Catechol-O-Methyltransferase (COMT) und der Monoaminoxidase (MAO) festgestellt. Es ist also möglich, daß die Toleranz in diesem Fall auf dem beschleunigten enzymatischen Abbau nicht des zur Gewöhnung

führenden Stoffes (Nicotin), sondern der durch diesen Stoff freigesetzten körpereigenen Wirkstoffe (Adrenalin, Noradrenalin) beruht. Da dabei die Pharmakokinetik des Nicotins nicht verändert wird, würde man dieses Prinzip definitionsgemäß ebenfalls als zelluläre Toleranz bezeichnen.

Abgesehen davon, daß konvulsive und letale Nicotinwirkungen kaum der Toleranz unterworfen sind, gibt es noch andere Wirkungsqualitäten, die ebenfalls kaum abgeschwächt werden. Isolierte Darmstücke von Versuchstieren, die längere Zeit Nicotin erhalten hatten, wiesen zum Beispiel keine herabgesetzte Empfindlichkeit auf (Busse 1952). (Für die beim Gewohnheitsraucher ausbleibende Übelkeit und Diarrhoe nach Rauchen einer Zigarre sind daher eher zentral vermittelte Mechanismen verantwortlich.)

Die Gewöhnung an Nicotin kann bei den einzelnen Wirkqualitäten also quantitativ verschieden stark in Erscheinung treten; das ist ein weiterer Hinweis auf vorwiegend zelluläre Toleranz im Sinne von Stille u. Coper (1980). Auch der zeitliche Verlauf der Toleranzentwicklung ist abhängig von der Wirkqualität.

Im Extremfall kann eine Toleranz bereits bei der zweiten Applikation sichtbar werden ("acute tolerance"). Dies ist zum Beispiel bei der motorischen Aktivität von Ratten der Fall; an der Rechts-Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve nach einmaliger intraperitonealer Injektion von Nicotin läßt sich die akute Gewöhnung ablesen (Stolerman et al. 1974). Die Autoren hatten diese Art von Toleranz zuvor in einem separaten Ver-

such (Stolerman et al. 1973) auch durch wiederholte intraperitoneals Injektion, Zufuhr mit dem Trinkwasser und Einpflanzung von Nicotin-Reservoirien (siehe auch Seite 26) erzielt. Die Erzeugung der Toleranz durch intraperitoneale Injektionen verbrauchte dabei am wenigsten Substanz. Daraus wurde gefolgert, daß eine kontinuierliche Zufuhr von Nicotin die Gewöhnung nicht notwendigerweise beschleunigt.

Diese Argumentation ist jedoch nur ausnahmsweise schlüssig, nämlich dann, wenn Wirkungen untersucht werden, gegen die sich schon nach sehr kurzer Zeit - auch bei diskontinuierlicher Zufuhr - Toleranz ausbildet. Seevers (1958) betonte mit Recht die Notwendigkeit häufiger, besser aber ununterbrochener Zufuhr einer Substanz zur Erzeugung von Toleranz und Abhängigkeit.

Zu diesem Zweck verwendet man im Falle von Alkohol die kontinuierliche Zufuhr mit der Atemluft; Morphin wird aus unter die Haut gepflanzten "pellets" kontinuierlich abgegeben. Wenn die Gewöhnung an Nicotinwirkungen untersucht werden soll, dann bietet das NAS eine exzellente Möglichkeit, rasch Toleranz zu erzeugen.

Um dies zu zeigen, wurden zwei Wirkqualitäten ausgewählt, die aufgrund ihrer Reproduzierbarkeit über längere Zeit meßbar sind und die nicht allzu schnell durch Toleranz verschwinden. Es handelt sich um die Senkung der Körpertemperatur durch Nicotin und die im "hot plate"-Test meßbare antinocizeptive Wirkung des Nicotins.

7.1 Die Nicotin-bedingte Hypothermie

Bei der Beeinflussung der Körpertemperatur eines Warmblüters durch Nicotin ist zwischen Wirkungen auf den Energiehaushalt des Körpers einerseits und auf die hypothalamische Temperaturregulation andererseits zu unterscheiden. Obwohl Nicotin die peripheren Gefäße aufgrund seiner ganglienstimulierenden Wirkung kontrahiert (Rottenstein et al. 1960) - die Hauttemperatur nimmt demzufolge ab -, ändert sich die Kerntemperatur des menschlichen Organismus wenig. Brundin (1980) stellte jedenfalls bei rauchenden Menschen nur eine geringfügige Steigerung der venösen Bluttemperatur fest - dies überrascht angesichts der bekannten stoffwechselsteigernden und "wärmeerzeugenden" Wirkung des durch Nicotin freigesetzten Adrenalins.

Bei der calorigenen Wirkung des aus dem Nebennierenmark ausgeschütteten Adrenalins wird die Steigerung des Energiestoffwechsels aber von einer kompensatorischen und auch direkten Wirkung auf die Thermoregulation überlagert. So bewirkt Noradrenalin, intracisternal zugeführt, bei der Ratte eine Senkung der Körpertemperatur (Bruinvels 1973). Da sich in der Meßgröße "Kerntemperatur" vor allem die Beeinflussung des Thermoregulationszentrums niederschlägt, ist ihre Änderung unter dem Einfluß von Nicotin Ausdruck einer zentralen Wirkungsweise.

Auch in der älteren Literatur (Lickint 1939; Larson et al. 1961) wird berichtet, daß Zigarettenrauchen die Körpertemperatur kaum beeinflusst oder nur ge-

ringfügig ansteigen läßt. Erst nach Aufnahme toxischer Mengen Nicotin oder Tabak wurde eine Temperatursenkung festgestellt, und Schutz vor Wärmeverlust (Brugsch 1965) bzw. Wärmezufuhr (Wirth u. Gloxhuber 1981) sind wichtige therapeutische Maßnahmen bei der akuten Nicotinvergiftung. Die meisten Versuchstiere, vor allem Ratten, Meerschweinchen und Hunde, zeigen nach Aufnahme größerer Nicotinmengen eine Temperatursenkung (Larson et al. 1961).

Maren (1951) fand bei Ratten eine dosisabhängige Temperatursenkung nach Dosen von 2 und 5 mg/kg (s.c.). An durch Hefe-Injektionen fieberig gemachten Ratten war die Temperatursenkung durch Nicotin noch deutlicher ausgeprägt. Der Autor bezeichnete Nicotin deshalb als Antipyretikum und fand, daß es 60 mal so wirksam sei wie Salicylsäure. Es ist allerdings die Frage, ob die gewaltigen Störwirkungen des Nicotins Patienten bei der Fieberbekämpfung zugemutet werden dürfen.

Bei sehr großen, fast tödlichen Nicotindosen (25 bis 32,5 mg/kg subcutan) bleibt die Hypothermie viele Stunden lang (!) bestehen, wie Becker u. King (1966) an weiblichen Ratten feststellten. Auch bei Mäusen tritt nach Nicotinzufuhr eine Senkung der Körpertemperatur ein (Bastian 1961). Batt u. Topping (1979) fanden in dieser Hinsicht ein abweichendes Verhalten bei genetisch fixiert fettsüchtigen Mäusen. Diese Mutante zeichnet sich durch eine recht instabile Temperaturregulation aus. Bei Raumtemperatur (22 bis 25°C) liegt die Körpertemperatur dieser Tiere nur bei etwa 36°C im Vergleich zu 38°C bei normalen Mäusen.

Bei Kältestreß (0 bis 3°C) fällt die Körpertemperatur der fettsüchtigen Mäuse auch schneller ab und erreicht kein Plateau. Bemerkenswert ist aber vor allem die sehr schwache, nicht signifikante Temperaturabnahme nach Nicotینگabe (0,5 mg/kg, s.c.), während normale Mäuse mit einem hochsignifikanten Temperaturabfall reagieren. Batt u. Topping führen die abweichende Reaktion der Mutante auf eine gestörte zentrale Temperaturregulation (und nicht auf periphere Effekte) zurück.

Die für die Aufrechterhaltung der Körpertemperatur verantwortlichen neuronalen Mechanismen sind noch nicht im einzelnen aufgeklärt. Horowitz u. Horwitz (1979) geben einen kurzen Überblick über die in der Diskussion befindlichen Modelle. Nach ihren Angaben ist es strittig, auf welche Weise neuronale Strukturen den "set point", die Solltemperatur des Regelkreises also, festlegen können und den Warmblüter mit Hilfe der Thermoregulation lebenslang auf konstanter Körpertemperatur zu halten vermögen. Man hält es zum Beispiel für denkbar, daß die Signale stark temperatur-empfindlicher hypothalamischer Neurone mit denen von nahezu temperaturunempfindlichen Neuronen mit hinlänglich konstanter Aktivität als "Standard" verglichen werden. Selbst die Lokalisation des Thermoregulationszentrums in den Hypothalamus ist nicht unumstritten, da zum Beispiel auch im Rückenmark und in der Großhirnrinde thermosensitive Neurone gefunden worden sind (Reaves u. Hayward 1979).

Nicotin erzeugt auch bei Perfusion durch die cerebralen Ventrikel bei Affen (Hall u. Myers 1971), Ratten

und Katzen (Hall 1973) Hypothermie, aber es ist noch nicht geklärt, auf welche Weise die - sicherlich zentral bedingte - Temperatursenkung zustandekommt.

Für die Untersuchung der Toleranzentwicklung bei kontinuierlicher Nicotinzufuhr wurde die Messung der Temperatur deshalb ausgewählt, weil sie die Ratte kaum belästigt, keine körperlichen Schäden verursacht wie zum Beispiel Blutverluste und somit täglich durchgeführt werden kann. Es verwundert daher nicht, daß auch zur Untersuchung der Ethanol-Toleranz bei Ratten die Temperatursenkung als Kriterium herangezogen wurde (Frankel et al. 1978 und viele andere).

Mansner et al. (1974) fanden die Rektaltemperaturen von Mäusen nach subcutaner Injektion von 0,125 mg/kg Nicotin unverändert, bei Injektion von 2,5 mg/kg dagegen um 3,5 °C herabgesetzt. Dieser deutliche Effekt konnte durch Vorbehandlung mit Mecamylamin, dagegen nicht mit Hexamethonium, aufgehoben werden - ein Zeichen für den zentralen Angriffspunkt. Mansner et al. konnten nach chronischer - nicht aber nach akuter - Gabe von Nicotin Toleranz gegen die temperatursenkende Wirkung dieser Substanz erzeugen. Hierzu waren allerdings drei tägliche subcutane Injektionen zu je 5 mg/kg (!) über vier Tage notwendig.

Doch nun zu den eigenen Versuchen!

Die kontinuierliche Zufuhr des Nicotins durch das NAS hat unter anderem den Vorteil, daß man Veränderungen der Körpertemperatur registrieren kann, ohne eine Testdosis injizieren zu müssen und damit die Tiere unter emotionalen Streß zu setzen. Die Zufuhrgeschwindigkeit des

NAS reicht jedenfalls aus, um in den ersten Tagen nach Implantation eine deutliche Hypothermie hervorzurufen (Abbildung 30). Später wurde allerdings - vor allem, um die Ergebnisse in eine allgemein vergleichbare Form zu bringen - in einem separaten Experiment die Körpertemperatursenkung nach festgelegten Test-Injektionen (1 mg/kg i.p.) vor und nach der kontinuierlichen Zufuhr bestimmt.

Die Messung der Körpertemperatur geschah mit einem elektrischen Thermometer (atmos-"Thermovit 4400") 3,5 cm tief im Mastdarm der Ratte. Nach 20 Sekunden Wartezeit für den Wärmeausgleich wurde dann die Temperatur an der Skala des Instruments abgelesen. Weitere Einzelheiten sind in den Versuchsbeschreibungen zu finden.

In Abbildung 30 sieht man den Verlauf der Körpertemperatur während des Versuchs 2 aufgezeichnet und erkennt deutlich, daß die anfängliche Hypothermie noch während der Nicotinzufuhr fast völlig verschwindet. Leider ist die Temperaturkurve infolge der beiden Blutentnahmen und der damit verbundenen Beeinflussung der Tiere etwas verzerrt. Um ein Bild von der Dosisabhängigkeit und dem zeitlichen Verlauf der Nicotin-Hypothermie zu erhalten, wurden jeweils vier Tiere mit physiologischer Kochsalzlösung bzw. verschiedenen stark konzentrierten Nicotintartratlösungen behandelt. Nach der NaCl-Injektion tritt infolge der Beunruhigung der Tiere eine leichte Temperaturerhöhung ein (vgl. De Castro 1980). Abbildung 31 läßt das Maximum des Temperaturabfalls 30 min nach Injektion und die Dosisabhängigkeit dieses Effekts deutlich erkennen (Daten von Versuch Nr.5). Da bei 1 mg/kg Nicotin (als Tartrat intraperitoneal zugeführt) bereits eine Tem-

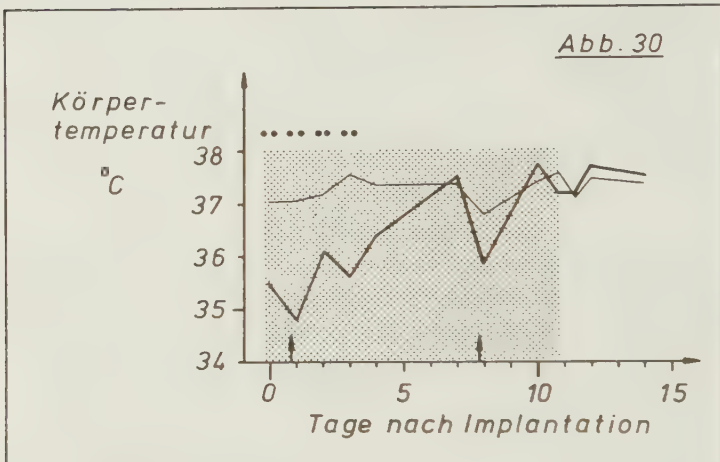


Abbildung 30: Körpertemperaturverlauf unter gleichmäßiger Nicotinzufuhr (Versuch 2)

Stark gezeichnete Linie: Gruppe N, $n = 5$, Zufuhrrate (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) $0,97 \pm 0,17 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$;

Dünn gezeichnete Linie: Gruppe C, $n = 5$, scheinoperiert.

Während der Nicotinzufuhr (Rasterfläche) wurden zu den in der Graphik mit Pfeilen kenntlich gemachten Zeitpunkten bei allen Tieren Blutproben entnommen. Die zwei Punkte über jedem der vier ersten Behandlungstage symbolisieren die Signifikanz des Mann-Whitney-Wilcoxon-Tests ($p \leq 0,01$). An allen anderen Meßterminen war der Unterschied nicht signifikant ($p \leq 0,05$).

peratursenkung um 2 K eintritt, wurde diese Menge als Testdosis festgelegt. Eine solche Testdosis wurde den Tieren in Versuch 6 einige Tage vor der Implantation zugeführt, um die Reaktion "naiver" Ratten

auf Nicotin festzustellen. Als Kontrolltiere dienten bei diesem Experiment "pair-fed"-Tiere, damit möglicherweise durch die Körpergewichtsänderung allein verursachte Effekte ausgeschlossen wurden. Zu zwei verschiedenen Zeitpunkten nach der Explantation wurde jeweils wieder eine Testdosis injiziert und die sich anschließend einstellende Hypothermie gemessen. Beim ersten Termin, fünf Stunden nach Explantation, konnte so gut wie gar kein aus dem NAS stammendes Nicotin mehr im Körper der Ratten gewesen sein, denn Nicotin wird in drei bis vier Stunden nahezu vollständig eliminiert (siehe Seite 13). Zu diesem Zeitpunkt - das ist aus Abbildung 32 deutlich zu erkennen - hatte sich fast vollständige Toleranz eingestellt. Im Vergleich zur "pair-fed"-Kontrollgruppe war die Hypothermie signifikant ($p \leq 0,001$) abgeschwächt. Auch bei der zweiten Messung (drei Tage später) war die Toleranz noch erhalten.

Abbildung 31: Dosisabhängigkeit des Körpertemperaturabfalls nach akuter Gabe von Nicotin (Versuch 5)

Gruppenaufteilung:

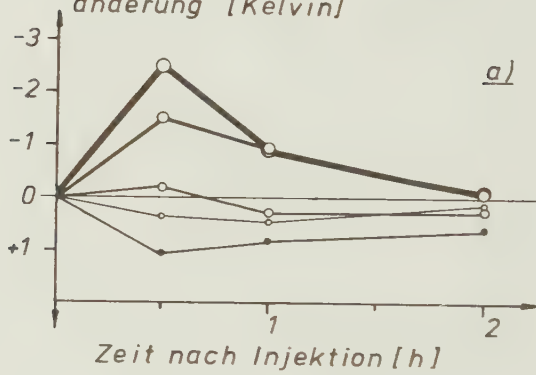
- : n = 4, 1 ml/kg 0,9% NaCl-Lösung,
- : n = 4, 0,16 mg/kg Nicotin (als Tartrat, 1 ml/kg),
- : n = 4, 0,33 mg/kg Nicotin (als Tartrat, 1 ml/kg),
- : n = 4, 0,81 mg/kg Nicotin (als Tartrat, 1 ml/kg),
- : n = 4, 1,63 mg/kg Nicotin (als Tartrat, 1 ml/kg).

a) Zeitlicher Verlauf des Temperaturabfalls; eingezeichnet sind die Mittelwerte jeder Gruppe;

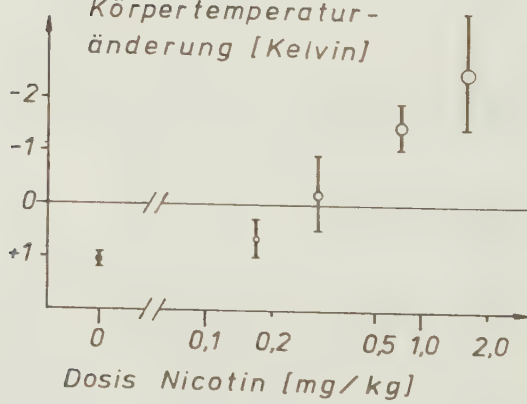
b) Dosisabhängigkeit des Effekts: Mittelwert und Standardabweichung für jede Gruppe sind - gemessen eine halbe Stunde nach Injektion - gegen eine logarithmisch aufgeteilte Dosis-Skala aufgetragen.

Körpertemperatur-
änderung [Kelvin]

Abb. 31



Körpertemperatur-
änderung [Kelvin]



b)

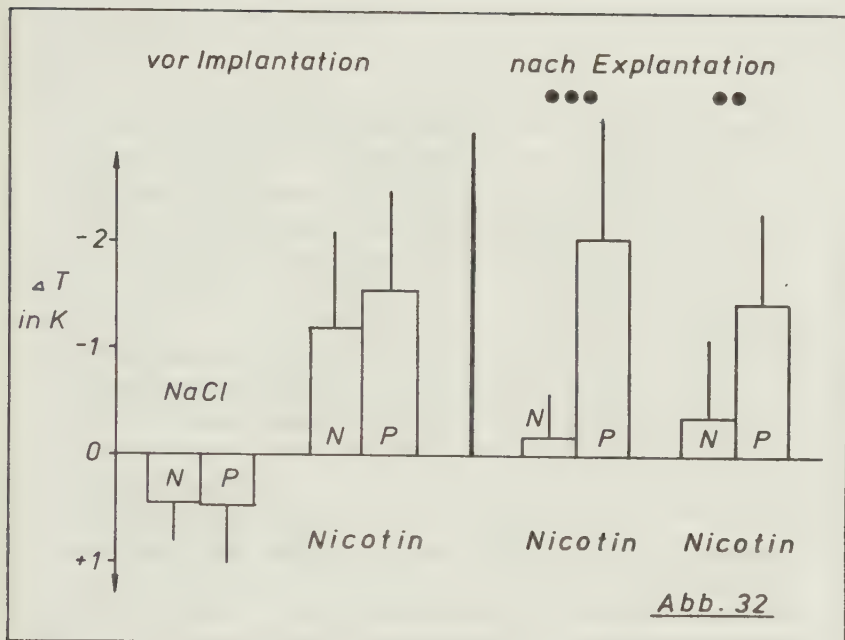


Abbildung 32: Toleranz gegenüber der nicotinbedingten Hypothermie
(Temperatursenkung in Kelvin; Versuch Nr. 6)

Gruppe N: $n = 10$, Nicotinzufuhr $0,53 \pm 0,08 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
(Mittelwert + Standardabweichung) über 7 Tage;

Gruppe P: $n = 10$, Scheinbehandlung mit "pair-feeding".

In der Graphik ist die Reaktion der Tiere auf eine intraperitoneale Injektion von 0,9%-iger Kochsalzlösung (1ml/kg; "NaCl") bzw. 1 mg/kg Nicotin (als Tartrat, 1 ml/kg; "Nicotin") für jede Gruppe als Block (Mittelwert mit Standardabweichung) dargestellt. Die ersten beiden Blockpaare sind Ergebnisse von Experimenten, die drei bis fünf Tage vor der Implantation mit den noch "naiven" Tieren durchgeführt wurden. Die erste Nicotin-injektion nach Explantation (drittes Blockpaar von links)

(Fortsetzung nächste Seite)

(Fortsetzung: Text zu Abbildung 32)

wurde fünf Stunden, die zweite (letztes Blockpaar) drei Tage nach der Entfernung des NAS vorgenommen.

Mit Hilfe der Punkte ist das Ergebnis des Mann-Whitney-Wilcoxon-Tests zwischen Nicotin- und "pair-fed"-Gruppe gekennzeichnet:

... - $p < 0,001$; .. - $p < 0,01$; sonst: nicht signifikant.

Wie die Versuchsergebnisse zeigen, stellt sich die Toleranz gegenüber der nicotininduzierten Hypothermie keineswegs innerhalb von Stunden ein; es dauert vielmehr mindestens fünf Tage, bis die Tiere, die unter dem ständigen Einfluß von Nicotin stehen, tolerant gegenüber dessen temperatursenkender Wirkung werden. Nach dem Nicotinentzug hält die Toleranz noch mindestens drei Tage an.

7.2 Antinocizeptive Wirkung

Ogleich schon in alten Berichten aus dem 16. Jahrhundert die Schmerzlinderung durch Tabak erwähnt wird (Lickint 1939), erscheint die Einstufung des Nicotins als Analgetikum zunächst befremdlich. Die antinocizeptive Wirkung des Nicotins ist ja auch nicht in diesem strengen Sinne zu verstehen, vielmehr handelt es sich nur um eine Bezeichnung für die abgeschwächte Reaktion von Versuchstieren auf einen definierten Schmerzreiz hin. Ob Aufnahme, Weiterleitung oder zentrale Verarbeitung des Schmerzes beeinflußt wird, soll hier nicht zur Diskussion stehen. In den hier referierten Versuchen ist die langsam schwindende antinocizeptive Wirkung vielmehr ein bequemer meßbarer Indikator für die sich entwickelnde Toleranz.

Die antinocizeptive Wirksamkeit von Nicotin ist seit langem bekannt. Wird die Gallenblase einer Katze künstlich gedehnt, so tritt ein visceraler Schmerz auf, der durch Nicotin wirksam gehemmt werden kann (Larson et al. 1961). Die meisten der in der letzten Zeit bekannt gewordenen Versuche zur antinocizeptiven Wirkung sind allerdings an Nagetieren durchgeführt worden und beziehen sich meist auf cutane Schmerzreize. In Tabelle 5 sind experimentelle Ergebnisse dieser Art mit Dosisangabe und Nennung wirksamer Antagonisten zusammengestellt.

Zu den am häufigsten verwandten Methoden gehören der "tail-flick"-Test, bei dem das Versuchstier seinen Schwanz aus der heißen Zone eines Brennstrahls ziehen muß, und die sogenannte "hot plate"-Methode (Woolfe u. MacDonald 1944). Bei dieser wird eine Ratte oder eine Maus auf eine sehr warme, aber nicht heiße (50 bis 60°C) Metallplatte gesetzt. Als Meßgröße dient dann die Zeit, die bis zu einer spezifischen Reizantwort (in der Regel das "Pfotenlecken") verstreicht. Nach der Reaktion wird das Versuchstier sogleich wieder von der Platte heruntergenommen.

Viele der in Tabelle 5 referierten Arbeiten befassen sich auch mit der wirksamen Antagonisierung der antinocizeptiven Wirkung des Nicotins. Hexamethonium versagte fast durchweg, während sich Mecamylamin in der Regel als wirksam erwies. Sahley u. Berntson (1979) fanden auch bei Scopolamin-HCl, einem schrankengängigen Anticholinergikum, eine Hemmung der Nicotinwirkung. Daraus leiteten sie für Nicotin auch bei dieser Wirkqualität einen zentralen Mechanismus ab

Tabelle 5: Erfolgreiche Versuche, Nicotin-Antinocizeption hervorzurufen

Spezies	Dosis	Methode	Wechselwirkungen	Autor
Maus	2,5 mg/kg s.c.	hot plate	Ant: Mecamylamin, Adiphenin + 0: Hexamethonium, Amphetamin, Physostigmin Syn: Chlorpromazin, Morphin	Mattila et al. (1968)
Kaninchen	2,5 mg/kg s.c.	elektrische Reizung des Zahnerven	Ant: Mecamylamin Syn: Chlorpromazin	Mattila et al. (1968)
Maus	3 mg/kg und 10 mg/kg s.c.	hot plate	Ant: Mecamylamin + 0: Amphetamin	Barthelemy et al. (1970)
Ratte	8,7 mg/kg s.c. (ED ₅₀)	tail-flick	Ant: (systemische Applikation) Atropin, Strychnin, "Gr. 858"	Andreas u. Wagner (1972)
Maus	2,5 mg/kg s.c.	hot plate		Mansner (1972)

Tabelle 5 (Fortsetzung):

Spezies	Dosis	Methode	Wechselwirkungen	Autor
Maus	7,5 bis 10 mg/kg i.p.	hot plate und: °)	Ant: Mecamylamin, Physostigmin Tremorin Syn: Oxotremorin	Phan et al. (1973)
	5 bis 15 mg/kg i.p.	hot plate		
		tail-flick		
	150 µg intraventrikulär		Ant: Mecamylamin	
Maus	2,5 mg/kg s.c.	hot plate	Ant: Mecamylamin	Mansner et al. (1974)
Ratte	0,16 bis 0,5 mg/kg s.c.	tail-flick	Ant: Mecamylamin, Scopolamin-HCl + 0: Hexamethonium, Naloxon-HCl, — Methylscopolaminium	Sahley u. Berntson (1979)
	25 und 50 µg intraventrikulär			

°): Messung der Schmerzreaktion nach intraperitonealer Injektion von verdünnter (1%-iger) Essigsäure;

Abkürzungen: "Ant" - Wirkungsabschwächung; "—" - keine Wechselwirkung; "Syn" - Wirkungsverstärkung.

und vermuteten die Beteiligung cholinерger Mechanismen.

Diese Argumentation ist plausibel und wird durch andere Autoren unterstützt. Andreas u. Wagner (1972) führten über die in der Tabelle 5 aufgeführten Experimente hinaus auch Versuche an spinalisierten Tieren durch, bei denen sich auch die Nicotinantagonisten DMPP (Dimethylphenylpiperazin) und TMA (Tetramethylammonium) als antinocizeptiv wirksam erwiesen (intramedulläre Applikation). Außer den genannten Antagonisten könnten auch d-Tubocurarin und Hemicholinium, intramedullär zugeführt, die Nicotinwirkung aufheben.

Bei Primaten scheint Nicotin keinen großen Einfluß auf die Schmerzempfindung zu haben. Pert (1975) berichtete über Versuche an Rhesusaffen mit elektrischer Reizung der Fußsohle. Während sich Morphin, Scopolamin und Physostigmin als antinocizeptiv wirksam erwiesen, zeigten weder Nicotinagonisten (Nicotin) noch -antagonisten (Mecamylamin und Hexamethonium) eine solche Wirkung.

Die antinocizeptive Wirkung von Nicotin unterliegt wie die Hypothermie der Toleranz. Mattila et al. (1968) behandelten 20 Mäuse zehn Tage lang alle zwölf Stunden mit 2,5 mg/kg Nicotin und stellten dann eine Wirkungsverminderung fest. Wurde alle 24 Stunden (ebenfalls für zehn Tage) Morphin (20 mg/kg i.p.) bzw. Nicotin (2,5 mg/kg s.c.) appliziert, so prägte sich eine wechselseitige Kreuztoleranz aus.

Wurde für vier bzw. zehn Tage dreimal täglich injiziert (5 mg/kg s.c., Maus), war die "analgetische" Wirkung ebenfalls zum Verschwinden zu bringen (Mansner 1972).

In den eigenen Experimenten konnte die antinocizeptive Nicotinwirkung im "hot plate"-Test an der Ratte bestätigt werden. Vorversuche mit einer Brennstrahlapparatur und elektrischer Reizung der Schwanzwurzel erreichten nicht die Aussageschärfe, die zur Abschätzung des Ausmaßes der Toleranz nötig ist, und schienen auch für die Tiere belastender zu sein. Leider findet man in der Literatur (Tabelle 5) kaum Angaben über die optimale Temperatur der "hot plate". Zur Vermeidung thermischer Schäden an der Pfotenunterseite ist ein zeitliches Limit notwendig, bei dessen Überschreitung die Ratte auch nach noch nicht erfolgter Reaktion von der Platte zu nehmen ist. Unter dem Einfluß starker Analgetika könnten sonst solche Schäden entstehen, ohne daß das Tier eine Schmerzreaktion zeigt.

Da das Limit die statistische Verteilung der Meßwerte beeinflußt, kann für die Signifikanzberechnung nur ein nichtparametrischer Test verwandt werden. Bei den dargelegten Experimenten wurde der Mann-Whitney-Wilcoxon-Test eingesetzt. In den Zeichnungen ist das Limit mit einer gestrichelten Linie gekennzeichnet.

Anders als bei der Hypothermie erscheint die laufende Kontrolle der antinocizeptiven Wirkung während der kontinuierlichen Nicotinzufuhr nicht angebracht, da Konditionierungsmechanismen wirksam werden könnten und Aussagen über Toleranz verfälschen würden.

Die Zufuhrtrate reicht jedoch aus, um eine deutliche Hemmung der Reaktion auf den Wärmereiz hervorzurufen. Bei einer Plattentemperatur von 56°C wurde (Versuch 3) drei Tage nach Implantation eine Latenzzeit von 17,3 s gegenüber 8,6 s bei den Kontrolltieren gemessen. Nach dem Mann-Whitney-Wilcoxon-Test ist der Unterschied signifikant ($p \leq 0,01$). Das Zeit-Limit lag bei diesem Test bei 20 s.

Ein Zusatzexperiment zeigte, daß die Wirkung deutlicher ablesbar wird, wenn die Temperatur der "hot plate" auf 52°C gesenkt wird. Wegen der geringeren Gefahr einer Pfotenschädigung konnte das Limit in diesem Fall auf 120 s erhöht werden (Versuch 5; Abbildung 33).

Das beschriebene Verfahren zur Messung der Nicotin-Toleranz durch Applikation von Testinjektionen (jeweils vor und nach der Behandlung mit dem NAS) wurde so eingerichtet, daß gleichzeitig auch die antinocizeptive Wirkung gemessen werden konnte. Nach Messung der Körpertemperatur wurde den Ratten also die Nicotin-Testdosis injiziert. Nach 10 min wurde nach der "hot plate"-Methode (52°C Plattentemperatur; Limit 120 s) die Schmerzempfindlichkeit gemessen und nach 30 min die Körpertemperatur zum zweiten Mal bestimmt (und damit die für die Auswertung wichtige Differenz).

Wie in Abbildung 34 dargestellt, tritt unter den Bedingungen der kontinuierlichen Zufuhr eine mehr als 50-prozentige Toleranz gegenüber der antinocizeptiven Wirkung ein. Ganz im Gegensatz zur Hypothermietoleranz ist die Gewöhnung an die antinocizeptive Wirkung von

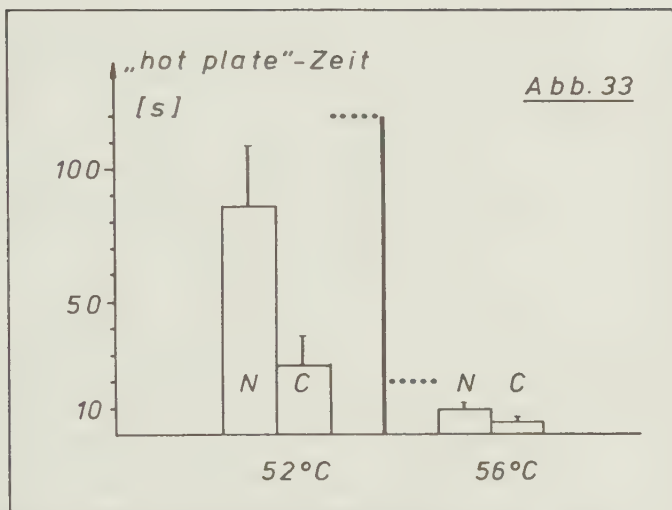


Abbildung 33: Auswirkung unterschiedlicher Plattentemperatur auf das Ergebnis des "hot plate"-Tests (Versuch 5)

Jede der vier Säulen repräsentiert Mittelwert und Standardabweichung der "hot plate"-Latenzzeit jeweils einer Gruppe von 4 weiblichen Ratten. Die mit "N" bezeichneten Tiere erhielten 10 min. vor der Messung 0,65 mg/kg Nicotin (als 2 mg/kg Nicotintartrat injiziert), die mit "C" bezeichneten Kontrolltiere 1 ml/kg isotonische NaCl-Lösung als intraperitoneale Injektion. Bei beiden Blockpaaren ist der auftretende Unterschied nach dem Mann-Whitney-Wilcoxon-Test signifikant ($p \leq 0,05$). Die Punktlinien kennzeichnen das zeitliche Limit, bei dem die Ratte auch ohne Reaktion von der Platte genommen wurde; in diesem Fall wurde der Wert "120 s" bzw. "20 s" zugeordnet.

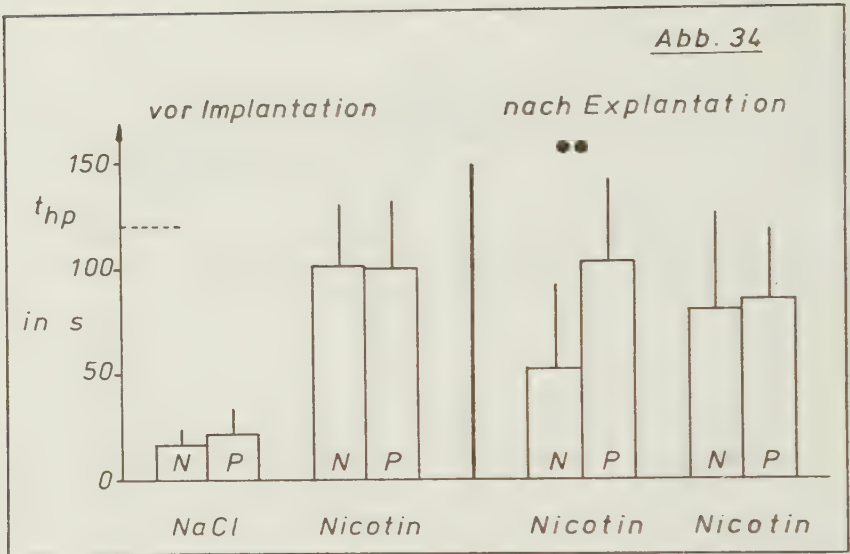


Abbildung 34: Toleranz gegenüber der antinocizeptiven Wirkung des Nicotins (Versuch Nr. 6)

Ordinate: "hot plate"-Latenzzeit in Sekunden; die unterbrochene waagrechte Linie deutet das geltende Zeit-Limit von 120 s an (Plattentemperatur: 52°C).

Gruppe N: $n = 10$, Nicotinzufuhr $0,53 \pm 0,08 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
(Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) über 7 Tage;

Gruppe P: $n = 10$, Scheinbehandlung mit "pair-feeding".

In der Graphik ist die Reaktion der Tiere auf eine intraperitoneale Injektion von 0,9%-iger Kochsalzlösung (1 ml/kg; "NaCl") bzw. 1 mg/kg Nicotin (als Tartrat, 1 ml/kg; "Nicotin") für jede Gruppe als Block (Mittelwert mit Standardabweichung) dargestellt. Die ersten beiden Blockpaare sind Ergebnisse von Experimenten, die drei bis fünf Tage vor der Implantation an den bis dahin noch Nicotin-"naiven" Tieren durchgeführt wurden. Die erste

(Fortsetzung nächste Seite)

(Fortsetzung Text zu Abbildung 34)

Nicotininjektion nach der Explantation (drittes Blockpaar von links) wurde fünf Stunden, die zweite (letztes Blockpaar) drei Tage nach der Entfernung des NAS vorgenommen.

Das Ergebnis des Mann-Whitney-Wilcoxon-Tests ist mit Hilfe der Punktsymbole ausgedrückt:

•• - $p \leq 0,01$; sonst: nicht signifikant.

Nicotin bereits nach drei Tagen wieder verschwunden. Für dieses ungewöhnlich schnelle Nachlassen der Toleranz gegenüber der antinocizeptiven Wirkqualität ließen sich keine vergleichbaren Ergebnisse aus der Literatur finden. Bei den meisten Nicotinwirkungen bleibt die Toleranz recht lange bestehen; so dauert die Toleranz gegenüber der reduzierten motorischen Aktivität durch Nicotin nach Stolerman et al. (1973) noch mindestens 80 Tage an.

8. Versuchsbedingungen bei den Tierexperimenten

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Tierexperimente wurden an Sprague-Dawley-Ratten ausgeführt. Lieferant war die Firma Willi Gassner in 8741 Sulzfeld. In Tabelle 6 sind wichtige Parameter der im Text erwähnten Tierversuche zusammengefaßt. Im einzelnen wurde bei der Gewinnung der Daten wie folgt vorgegangen:

Die Haltung der Tiere erfolgte in Einzelkäfigen aus verzinktem, an Vorder-, Ober- und Unterseite des Käfigs angebrachtem Drahtgeflecht (Maschenweite 8 mm) und verzinktem Stahlblech (Rückseite sowie linke und rechte Käfigseite). Die Höhe betrug 18 cm bei einer Grundfläche von 15 x 24 cm.

Die umgebende Luft wurde durch Thermostatisierung auf konstant $22 \pm 1^\circ\text{C}$ gehalten und die Luftfeuchterege- lung des klimatisierten Tierraums sorgte für eine gleichmäßige relative Feuchte von ca. 55%.

Die Beleuchtung (Leuchtstoffröhren) wurde täglich für zwölf Stunden (von 8 bis 20 Uhr) eingeschaltet. In der übrigen Zeit, während der die nachtaktiven Ratten das Gros der angebotenen Futter- und Trink- menge zu sich nahmen, herrschte Dunkelheit.

Bestimmung des Körpergewichts:

Die Tiere wurden täglich zur gleichen Tageszeit auf einer Digitalwaage (Digimetric type 20 DT, Fa. Ains- woth) bei einer Ablesegenauigkeit von 0,1 g auf 1 g genau gewogen. Die korrekte Einstellung wurde in angemessenen Abständen mit einem 1000,0-g-Eichgewicht kontrolliert.

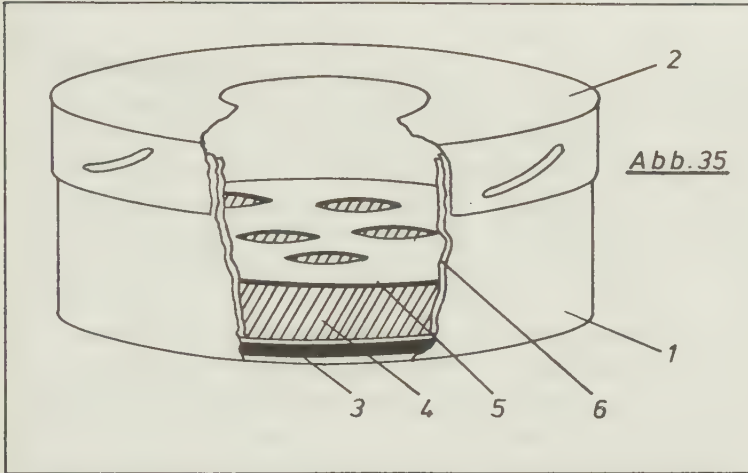


Abbildung 35: Futterbehälter zur Bestimmung des freiwilligen Futterkonsums nach Fallon (1965)

In die Aluminiumdose (1) ist zur Beschwerung eine Bleiplatte (3) und ein Kunststoffbehälter (6) zur Aufnahme des Futters (4) eingesetzt. Um ein Verstreuen von Nahrung zu verhindern, liegt ein Aluminium-Lochblech (5) auf, welches 16 kreisrunde Löcher von je 16 mm Durchmesser aufweist. Das ganze Gefäß wird mit einem Schraubdeckel (2) - ebenfalls aus Aluminium - verschlossen.
(Abbildung in Originalgröße)

Bestimmung der aufgenommenen Nahrungsmenge:

Für die Fütterung wurde stets "altromin Standard-Diät tpf^R 1320" (Hersteller: Altromin GmbH, 4910 Lage/Lippe) verwendet, das gewöhnlich in Form von Preßlingen (1 cm Dicke) verfüttert wird.

Für die Bestimmung der täglich freiwillig aufgenommenen Nahrungsmenge wurde ein Nachbau (siehe Abb. 35)

des "eatometers" nach Fallon (1965) verwandt, welches ein Verstreuen des Futters bei der Nahrungsaufnahme weitgehend verhindert und die Wägung der verzehrten Menge leicht ermöglicht. Der Einsatz wurde ebenfalls mit "Altromin"-Futter der obengenannten Spezifikation beschickt; dazu wurden die "Pellets" allerdings auf maximal einen Millimeter Korngröße vermahlen.

Für die praktische Durchführung des "pair-feeding" (vgl. S. 105) tauschte man den Einsatz des "eatometers" (Teile 3 bis 6 der Abbildung 35) gegen eine in etwa halbkugelige Glasschale aus. In diese wurde einem Kontrolltier täglich diejenige Nahrungsmenge eingewogen, die ein gleichschweres, behandeltes Tier am Tag zuvor verzehrt hatte. Das "pair-feeding" wurde etwa fünf bis sechs Tage vor der Implantation des NAS begonnen und bis zur Explantation fortgeführt. Anschließend bekamen die "pair-fed"-Kontrollen (Gruppe P) das Futter wieder - wie die anderen Tiere auch - in dem Gefäß nach Abbildung 35 angeboten.

In den ersten Tagen nach der Umstellung auf "pair-feeding" lassen manche Ratten gelegentlich einen Rest von wenigen Gramm Futter in der Glasschale. Diese Menge wurde bei der täglichen Wägung verworfen und von der zugemessenen Futtermenge abgerechnet.

Trinkwasser:

Für alle Ratten war über die gesamte Versuchsdauer täglich frisches Trinkwasser im Überfluß verfügbar. Die hierzu in den Käfig eingehängten, zylindrischen Trinkflaschen aus Glas konnten bei Erfordernis des Versuchs täglich gewogen werden und ließen damit eine Messung der aufgenommenen Tagestrinkmenge zu.

Implantation:

Den zu behandelnden Ratten wurde - wie auf S. 73 beschrieben - jeweils ein Nicotinabgabesystem (NAS) subcutan unter die Rückenhaut implantiert. Nach Ablauf einer Spanne von 7 bis 16 Tagen wurden die Geräte wieder entfernt. Kontrolltiere und "pair-fed"-Kontrollen (Gruppen C und P) wurden mit leeren NAS scheinbehandelt. Bei den paargefütterten Kontrolltieren hinkten die Im- und Explantationstermine um genau 24 h hinter denen der behandelten Tieren her, damit auch in dieser Hinsicht die Zeitverschiebung durch das "pair-feeding" mit vollzogen wurde. (Bei der Auswertung und graphischen Darstellung der Versuche wurde diese Zeitverschiebung wieder rückgängig gemacht.)

Die Methodik der Blutentnahme und die Bestimmung der Nicotinkonzentration im Blut ist in Abschnitt 5 (S. 65 ff.) eingehend erörtert und beschrieben.

Messung der Körpertemperatur:

Der biologische Parameter Körpertemperatur ist stark abhängig vom jeweiligen psychischen Erregungszustand der Ratte. Aus diesem Grund mußte die Messung schnell und stets zur gleichen Tageszeit erfolgen. Hierzu wurde die Sonde eines elektrischen Fernthermometers ("atmos-Thermovit 4400") 3,5 cm tief in den Mastdarm des Tieres eingeschoben und die Temperatur nach 20 s abgelesen. Auf diese Weise konnte die Kerntemperatur der Ratten täglich, vor allem während der kontinuierlichen Nicotinzufuhr bestimmt werden.

Messung der "hot plate"-Latenzzeit:

Die "hot plate"-Apparatur besteht aus einer (durch zirkulierendes Wasser konstanter Temperatur) beheizten, kreisrunden Edelstahlplatte (Durchmesser 20 cm), auf

der - um ein Entkommen der Versuchstiere zu vermeiden - ein Hohlzylinder aus Plexiglas angebracht ist.

Die Ratte wird nun auf die Platte gesetzt, und die Zeit (Latenzzeit) gemessen, die bis zu einer spezifischen Reaktion des Tieres (Pfotenlecken) verstreicht; in diesem Augenblick wird das Tier wieder von der Platte heruntergenommen. Erfolgte nach Ablauf des "Zeitlimits" (bei 52°C Plattentemperatur: 120 s, bei 56°C: 20 s) keine Reizantwort, so wurde dieses Zeitlimit als Latenzzeit in das Meßprotokoll aufgenommen.

Weil sich die "hot plate"-Methode nicht gut zur täglichen Messung unter ständigem Nicotineinfluß eignet (vgl. S. 147/148), spielte der Test vor allem bei der kombinierten Bestimmung von Temperatursenkung und antinocizeptiver Wirkung (im nächsten Absatz beschrieben) eine Rolle. - Die Temperatur des im Heizmantel der "hot plate" kreisenden Wassers wurde durch einen Thermostaten (Haake, Typ F 4391) auf konstant 52°C (in Vorversuchen 56°C) gehalten.

Kombinierte Messung:

Um nach Injektion einer Testdosis Nicotin gleichzeitig die antinocizeptive und die körpertemperatursenkende Wirkung zu messen, geht man folgendermaßen vor:

1. Die Körpertemperatur einer Ratte wird auf übliche Weise bestimmt.
2. Unmittelbar danach erfolgt die i.p. Injektion von 1 mg/kg Nicotin (aus Nicotintartrat - Molekulargewicht 498,44 - bereitet; in 1ml/kg dest. Wasser). Zu einem anderen Termin wurden Injektionen von 1 ml/kg 0,9%-iger NaCl-Lösung verabreicht ("Nullwert" für jedes Tier).

3. 10 min nach der Injektion wird die "hot plate"-Latenzzeit bestimmt (Plattentemperatur 52°C; Zeitlimit 120 s).
4. 30 min nach der Injektion wird die Körpertemperatur der Ratte ein zweites Mal gemessen und aus beiden Temperaturmeßwerten die Differenz ermittelt.

Tabelle 6:

Auf einen Blick sind im oberen Teil der Tabelle die wichtigsten tierexperimentellen Daten abzulesen, während im unteren Teil die Seitenzahlen für die im Text dargestellten Ergebnisse zu finden sind.

Die 20 weiblichen Tiere von Versuch 5 wurden lediglich zu Vorversuchen für Temperatursenkung und "hot plate"-Test eingesetzt (siehe S. 139 f. und 148 f.) und sind daher nicht in der Tabelle erwähnt.

Geschlecht der Tiere: m - männlich; w - weiblich

Tabelle 6: Versuchsbedingungen und -ergebnisse der Tierexperimente

Versuch Nr:	1	2	3	4	6	8
Geschlecht:	m	w	w	w	w	w
Zufuhr rate ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	von 0,25	0,97	1,12	1,37	0,53	0,13 anfangs
(Mittelwert + St.-abw.)	bis 1,65,	+ 0,17	+ 0,10	+ 0,12	+ 0,08	+ 0,03
Anzahl der Tiere in Gruppe	siehe					
- N (Nicotin-Gruppe)	Seite 96 ff.	5	16	5	10	5
- P ("Pair-fed"-Gruppe)	-	-	-	5	10	5
- C (Kontrollgruppe)	8	5	6	-	-	5
Verweildauer des NAS (d)	15	11	16	14	7	14
Angaben über folgende Ergebnisse auf Seite:						
- Tiergewichte	96 ff.	102 ff.	-	106 ff.	108 f.	108, 110 ff.
- Nahrungsaufnahme	-	102 ff.	-	106 ff.	108 f.	108, 110 ff.
- Trinkwasseraufnahme	116 f.	102 ff.	-	106 ff.	-	-
- "hot-plate"-Test	-	-	148	-	-	-
- Körpertemperatursenkung	-	137 f.	-	-	-	-
- kombinierte Messung	-	-	-	-	-	-
- Best. der Nicotinkonz.	-	-	71-87	-	141 f./150 f.-	-
im Blut	-	-	-	-	-	-

9. Zusammenfassung

Untersuchungen der pharmakologischen Toleranzentwicklung setzen eine möglichst gleichmäßige Einwirkung des zur Gewöhnung führenden Stoffes voraus.

Das ist bei einer Substanz von so kurzer Wirkungs-
dauer wie Nicotin durch wiederholte Injektionen
nicht erreichbar. Deshalb sollte ein Nicotinab-
gabesystem (NAS) mit Reservoir entwickelt werden,
das zuverlässig die kontinuierliche Abgabe kleiner
Nicotinmengen über viele Tage hinweg ermöglicht
und dabei so dimensioniert ist, daß es kleinen
Labortieren unter die Haut implantiert werden kann.

Diese Aufgabe wurde gelöst. Das in der Arbeit be-
schriebene, in größerer Stückzahl aus Glas und Kunst-
stoff im Eigenbau hergestellte kleine Gerät, als
"Gerät zur gleichmäßigen Abgabe chemischer Stoffe"
zum Patent angemeldet, erfüllt alle gestellten An-
forderungen. Durch Dissolutionstests in vitro und
Implantationsexperimente in vivo konnte für dieses
NAS eine für mindestens zehn Tage konstante Abgaberate
(je nach Bauweise 100 bis 300 µg Nicotin in der
Stunde) nachgewiesen werden. Die eigens hierzu ent-
wickelte, zum Teil recht aufwendige, biopharmazeuti-
sche und analytische Methodik ist ausführlich be-
schrieben.

Im Tierexperiment unterdrückt kontinuierliche Ni-
cotinzufuhr die Nahrungsaufnahme. Dabei nehmen die
Ratten im Verlauf der Behandlung nach und nach wieder
mehr Futter auf, bis die vorherige Tagesmenge fast
wieder erreicht ist. Die Erklärung dieses Verhaltens
als kompensatorische Nahrungsaufnahme, die das Kör-
pergewicht auf einem bestimmten Niveau (Sollwert)

halten soll, ist besser begründet als die Annahme einer Gewöhnung an die anorexigene Wirkung von Nicotin. Tatsächlich bleibt der Abstand zwischen dem Körpergewicht behandelter Tiere und dem der Kontrolltiere in der letzten Behandlungswoche nahezu gleich. Gegen eine Toleranz spricht auch die exzessive Hyperphagie nach Nicotin-Entzug, die so lange anhält, bis das Durchschnittsgewicht der Kontrolltiere in etwa erreicht ist.

Teilt man scheinoperierten Ratten täglich dieselbe Nahrungsmenge zu, welche die mit dem NAS implantierten Tiere bei unbeschränktem Angebot aufgenommen haben ("pair-feeding"), so treten nach Entzug des Nicotins keine Unterschiede in zusätzlich aufgenommener Futtermenge und Körpergewichtszuwachs auf, das heißt die Tiere, die mit Nicotin behandelt worden waren, verhielten sich nicht anders als scheinbehandelte Tiere nach entsprechender Nahrungsbeschränkung. Die Annahme, daß die nach Aufhören der Nicotin-zufuhr zu beobachtende Gewichtszunahme auf eine Stoffwechseländerung zurückzuführen sei, wird durch diesen Befund nicht gestützt.

Im Gegensatz zur anorexigenen Nicotinwirkung, bei der sich keine echte Toleranz einstellte, konnte mit Hilfe des NAS Toleranzentwicklung gegenüber den folgenden Nicotinwirkungen nachgewiesen werden:

- Hemmung der Flüssigkeitsaufnahme,
- Herabsetzung der Körpertemperatur,
- antinocizeptive Wirkung.

Die Hemmung der Flüssigkeitsaufnahme - eine von der Nicotin-Anorexie unabhängige direkte Nicotinwirkung -

und die Herabsetzung der Körpertemperatur durch Nicotin konnten während der ständigen Nicotinzufuhr laufend verfolgt werden. Zur Bestimmung der verzögerten Reaktion auf einen thermischen Schmerzreiz ("hot plate"-Methode) wurden vor und zu zwei Zeitpunkten nach der Dauereinwirkung von Nicotin Testdosen (1 mg Nicotin pro kg Körpergewicht) intraperitoneal injiziert. Bei diesen Gelegenheiten wurde gleichzeitig die Hypothermie gemessen.

Fünf Stunden nach der Explantation - das aus dem NAS stammende Nicotin ist dann schon weitgehend eliminiert - wurde Gewöhnung gegenüber den beiden gleichzeitig gemessenen Wirkqualitäten festgestellt: Die Wirkungsstärken hatten um mehr als die Hälfte abgenommen. Drei Tage später war die Toleranz bei der antinocizeptiven Wirkung wieder verschwunden, während sie bei der Hypothermie noch vorhanden war.

Da die aktuelle Nicotinmenge im milieu interieur des Tierkörpers am zweiten, achten und zehnten Tag nach der Implantation des NAS die gleiche war, kann die beachtliche Toleranzleistung der Tiere nicht mit einem beschleunigten enzymatischen Abbau des zur Gewöhnung führenden Stoffes erklärt werden. Deshalb muß es sich um eine funktionelle Anpassung des Organismus an die Störung der Homöostase durch das ständig einwirkende Nicotin handeln, das heißt, es liegt eine funktionelle Toleranz ("true tolerance") vor.

10. Literatur

- ALI, B., KAUR, S., KUMAR, A., BHARGAVA, K.P.:
Comparative evaluation of stimulatory effects of oral tobacco and nicotine consumption on hepatic microsomal N-demethylations.
Biochem. Pharmacol. 29, 3087-3092 (1980).
- ALLAN, G.G., CHOPRA, C.S., NEOGI, A.N., WILKINS, R.M.:
Design and synthesis of controlled release pesticide-polymer combinations.
Nature (Lond.) 234, 349-351 (1971).
- ANDERSSON, K., FUXE, K., ENEROTH, P., GUSTAFSSON, J.-A., AGNATI, L.F.:
Mecamylamine induced blockade of nicotine induced inhibition of gonadotrophin and TSH secretion and of nicotine induced increases of catecholamine turnover in the rat hypothalamus.
Acta Physiol. Scand., Suppl. 479, 27-29 (1980).
- ANDREAS, K., WAGNER, U.:
Zur antinozifensiven Wirkung von Nikotin.
Acta biol. med. german. 29, 423-429 (1972).
- ARMITAGE, A.K., DOLLERY, C.T., GEORGE, C.F., HOUSEMAN, T.H., LEWIS, P.J., TURNER, D.M.:
Absorption and metabolism of nicotine from cigarettes.
Brit. med. J. 1975/4, 313-316 (1975).
- AROLA, Ll., PALOU, A., REMESAR, X., HERRERA, E., ALEMANY, M.:
Effect of stress and sampling site on metabolite concentration in rat plasma.
Arch. int. Physiol. Biochim. 88, 99-105 (1980).

AVERETT, J.W.:

The effects of nicotine on weight increment, activity, food intake, and water intake in weanling albino rats. Diss. Abstr. 23, 2187 (1962).

BÄTTIG, K.:

Rauchgewohnheit und Psychopharmakologie des Nikotins. Naturwiss. Rundschau 33, 356-361 (1980).

BAETTIG, K., MARTIN, J.R., CLASSEN, W.:

Nicotine and amphetamine: differential tolerance and no cross-tolerance for ingestive effects. Pharmacol. Biochem. Behav. 12, 107-111 (1980).

BALLARD, B.E., NELSON, E.:

Absorption of implanted solid drug. J. pharm. Sci. 51, 915-924 (1962).

BALFOUR, D.J.K.:

Studies on the biochemical and behavioural effects of oral nicotine. Arch. int. Pharmacodyn. 245, 95-103 (1980).

BARRER, R.M.:

Diffusion in and through Solids. University Press, Cambridge 1951.

BARTHELEMY, C., TREMBLAY, E., JACOB, J.:

Comparaisons de divers antagonistes de l'ésérine et de la nicotine chez la souris. J. Pharmacol. (Paris) 1, 369-382 (1970).

BASTIAN, J.W.:

Classification of CNS drugs by a mouse screening battery.
Arch. int. Pharmacodyn. 133, 347-364 (1961).

BASS, P., PURDON, R.A., WILEY, J.N.:

Prolonged administration of atropine or histamine in
a silicone rubber implant.

Nature (Lond.) 208, 591-592 (1965).

BATT, R.A.L., TOPPING, D.L.:

Acute effects of nicotine on plasma free fatty acid
concentrations and on the response to cold stress,
in lean and obese (genotype ob/ob) mice.

Int. J. Obesity 3, 7-13 (1979).

BECKER, R.F., KING, J.E.:

Studies on nicotine absorption during pregnancy.

II. The effects of acute heavy doses on mother and
neonates.

Am. J. Obst. Gynec. 95, 515-522 (1966).

BECKETT, A.H., GORROD, J.W., JENNER, P.:

The effect of smoking on nicotine metabolism in vivo
in man.

J. Pharm. Pharmacol., Suppl. 23, 62S-67S (1971).

BECKETT, A.H., TRIGGS, E.J.:

Enzyme induction in man caused by smoking.

Nature (Lond.) 216, 587 (1967).

BEHREND, A., THIENES, C.H.:

The development of tolerance to nicotine by rats.

J. Pharmacol. exp. Ther. 48, 317-325 (1933).

BENWELL, M.E.M., BALFOUR, D.J.K:

Effects of nicotine administration and its withdrawal on plasma corticosterone and brain 5-hydroxyindoles. Psychopharmacology 63, 7-11 (1979).

BIZZI, A., TACCONI, M.T., MEDEA, A., GARATTINI, S.:

Some aspects of the effect of nicotine on plasma FFA and tissue triglycerides. Pharmacology 7, 216-224 (1972).

BLÄSIG, J., HERZ, A., REINHOLD, K., ZIEGLGÄNSBERGER, S.: Development of physical dependence on morphine in respect to time and dosage and quantification of the precipitated withdrawal syndrome in rats. Psychopharmacologia 33, 19-38 (1973).

BLITZER, P.H., RIMM, A.A., GIEFER, E.E.:

The effect of cessation of smoking on body weight in 57,032 women: cross-sectional and longitudinal analyses. J. Chron. Dis. 30, 415-429 (1977).

BRADY, M.E., RITSCHER, W.A., SAELINGER, D.A., CACINI, W., PATTERSON, A.J.:

Animal model and pharmacokinetic interpretation of nicotine poisoning in man. Int. J. Clin. Pharmacol. Biopharm. 17, 12-17 (1979).

BRANDT, W.W.:

Model calculation of the temperature dependence of small molecule diffusion in high polymers. J. Phys. Chem. 63, 1080-1084 (1959).

BROOKE, D., WASHKUHN, R.J.:

Zero-order drug delivery system: Theory and preliminary testing.

J. Pharm. Sci. 66, 159-162 (1977).

BROZEK, J., KEYS, A.:

Changes of body weight in normal men who stop smoking cigarettes.

Science (Wash.) 125, 1203 (1957).

BRUGSCH, H.:

Akute Nikotinvergiftung im Kindesalter.

Internist. Prax. 5, 277-279 (1965).

BRUINVELS, J.:

Effects of intracisternal administration of metaraminol and noradrenaline on body temperature in the rat.

In: The Pharmacology of Thermoregulation. Schönbaum, E., Lomax, P. (eds.), Karger, Basel 1973, p. 194-201.

BRUNDIN, T.:

Effects of tobacco smoking on the blood temperature during exercise.

Acta Physiol. Scand., Suppl. 497, 43-47 (1980).

BRYAN, G.T., ERTÜRK, E.:

Production of mouse urinary bladder carcinomas by sodium cyclamate.

Science (Wash.) 167, 996-998 (1970).

BUNDESVERBAND DER PHARMAZEUTISCHEN INDUSTRIE e.V.:

Pharma-Daten 80. 10. Auflage, Frankfurt 1980.

BURN, J.H., TRUELOVE, L.H., BURN, I.:

The antidiuretic action of nicotine and of smoking.

Brit. med. J. 1945/1, 403-406 (1945).

BURROWS, I.E., CORP, P.J., JACKSON, G.C., PAGE, B.F.J.:

The determination of nicotine in human blood by gas-liquid chromatography.

Analyst 96, 81-84 (1971).

BUSSE, W.:

Über die Beteiligung des Magendarmkanals als Erfolgsorgan des vegetativen Nervensystems an der Nicotiningewöhnung.

Z. ges. exp. Med. 118, 573-582 (1952).

CASTRO, A., MONJI, N., MALKUS, H., EISENHART, W.,

McKENNIS jr., H., BOWMAN, E.R.:

Automated radioimmunoassay of nicotine.

Clin. Chim. Acta 95, 473-481 (1979).

CHRISTIE, AGATHA:

Nikotin.

Goldmann Taschen-Krimi Nr. 64.

CLASSEN, W., BÄTTIG, K.:

Nikotinwirkungen auf Körpergewicht und Fressverhalten der Ratte.

Soz. Präventivmed. 21, 142-143 (1976).

COMSTOCK, G.W., STONE, R.W.:

Changes in body weight and subcutaneous fatness related to smoking habits.

Arch. environm. Health 24, 271-276 (1972).

CONTE-DEVOLX, B., ROUGON-RAPUZZI, G., MILLET, Y.:
Dosage plasmatique radioimmunologique de la vasopressine:
réponse à la stimulation par la nicotine.
Ann. Endocrinol. (Paris) 37, 291-292 (1976).

CUGURRA, F., BALDINI, L.:
Sulla capacità dei cosiddetti ganglioplegici di bloccare la spinta ipermetabolica da freddo.- I) Scopo delle ricerche, metodi e azione della nicotina.
Boll. Soc. ital. Biol. sper. 31, 883-885 (1955).

DE CASTRO, J.M.:
Core temperature relationships with spontaneous behavior in the rat.
Physiol. Behav. 25, 69-75 (1980).

DEUTSCHE HAUPTSTELLE GEGEN DIE SUCHTGEFAHREN:
Zahlen zur Gefährdung durch Alkohol, Tabak, Rauschmittel und Medikamente. 6. Der Tabak.
DHS-Informationsdienst 33, 8-10 (1980).

DIXON, W.E., LEE, W.E.:
Tolerance to nicotine.
Quart. J. exp. Physiol. 5, 373-383 (1912).

DOST, F.H.:
Die Clearance.
Klin. Wschr. 27, 257-258 (1949).

DOST, F.H.:
Grundlagen der Pharmakokinetik.
2. Auflage, Thieme, Stuttgart 1968.

DOW, J., HALL, K.:

Estimation of plasma nicotine by combined capillary column gas chromatography-mass spectrometry.

Brit. J. Pharmacol. 61, 159P (1977).

DZIUK, P.J., COOK, B.:

Passage of steroids through silicone rubber.

Endocrinology 78, 208-211 (1966).

EDMUNDS, H.N., SACHDEV, K.:

A simple implantable system for delivery of halothane.

Anesthesiology 51, 334-335 (1979).

ELLISON, G., STAUGAITIS, S., CRANE, P.:

A silicone delivery system for producing binge and continuous ethanol intoxication in rats.

Pharmacol. Biochem. Behav. 14, 207-211 (1981).

ERBACHER, K., GRUMBRECHT, P., LOESER, A.:

Nikotin und innere Sekretion. I. Funktionsstörungen innersekretorischer Organe durch Nikotin.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol. 195, 121-142 (1940).

ERICKSON, C.K., KOCH, K.I., MCGINITY, J.W.:

Subcutaneous silastic implants: maintenance of high blood ethanol levels in rats drinking a liquid diet.

Pharmacol. Biochem. Behav. 13, 781-786 (1980).

FALKMAN, S.E., BURROWS, I.E., LUNDGREN, R.A.,

PAGE, B.F.J.:

A modified procedure for the determination of nicotine in blood.

Analyst 100, 99-104 (1975).

FALLON, D.:

Eatometer: a device for continuous recording of free-feeding behavior.

Science (Wash.) 148, 977-978 (1965).

FEYERABEND, C., RUSSELL, M.A.H.:

Improved gas-chromatographic method and microextraction technique for the measurement of nicotine in biological fluids.

J. Pharm. Pharmacol. 31, 73-76 (1979).

FEYERABEND, C., RUSSELL, M.A.H.:

Assay of nicotine in biological materials: sources of contamination and their elimination.

J. Pharm. Pharmacol. 32, 178-181 (1980).

FLYNN, G.L., ROSEMAN, T.J.:

Membrane diffusion II: Influence of physical adsorption on molecular flux through heterogeneous dimethylpolysiloxane barriers.

J. Pharm. Sci. 60, 1788-1796 (1971).

FOLKMAN, J., LONG, D.M., ROSENBAUM, R.:

Silicone rubber: a new diffusion property useful for general anesthesia.

Science (Wash.) 154, 148-149 (1966).

FRANKEL, D., KHANNA, J.M., KALANT, H., LeBLANC, A.E.:

Effect of p-chlorophenylalanine on the acquisition of tolerance to the hypothermic effects of ethanol.

Psychopharmacology 57, 239-242 (1978).

FRIDEN, G.B.:

Nicotine addiction.

J. Amer. med. Assoc. 242, 1361-1362 (1979).

GAGINELLA, T.S., BASS, P.:

Nicotine: release from silicone rubber implants *in vivo*.
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 7, 213-216 (1974).

GAGINELLA, T.S., WELLING, P.G., BASS, P.:

Nicotine base permeation through silicone elastomers:
comparison of dimethylpolysiloxane and trifluoropropyl-
methylpolysiloxane systems.

J. Pharm. Sci. 63, 1849-1853 (1974).

GEHLBACH, S.H., WILLIAMS, W.A., PERRY, L.D., WOODALL, J.S.:
Green-tobacco sickness.

J. Amer. med. Assoc. 229, 1880-1883 (1974).

GIBSON, R.D., TINGSTAD, J.E.:

Formulation of a morphine implantation pellet suitable
for tolerance-physical dependence studies in mice.

J. Pharm. Sci. 59, 426-427 (1970).

GILLETTE, J.R.:

The importance of tissue distribution in pharmacokinetics.

In: Pharmacology and Pharmacokinetics. Teorell, T.,
Dedrick, R.L., Condliffe, P.G. (eds.), Plenum Press,
New York 1974, p. 209-231.

GIMENEZ, M.S., JOHNSON, B.C.:

Pair-feeding in the dietary control of glucose-6-phosphate dehydrogenase.

J. Nutrition 111, 260-265 (1981).

GLADTKE, E., VON HATTINGBERG, H.M.:

Pharmakokinetik.

Springer, Berlin 1973.

GLAUSER, S.C., GLAUSER, E.M., REIDENBERG, M.M.,
RUSY, B.F., TALLARIDA, R.J.:
Metabolic changes associated with the cessation of
cigarette smoking.
Arch. environm. Health 20, 377-381 (1970).

GOODE, P.G.:
An implanted reservoir of morphine solution for rapid
induction of physical dependence in rats.
Brit. J. Pharmacol. 41, 558-566 (1971).

GORROD, J.W., JENNER, P.:
The metabolism of tobacco alkaloids.
In: Essays in Toxicology. Vol. 6, Hayes jr., W.J. (ed.),
Academic Press, New York 1975, p. 35-78.

GRITZ, E.R., JARVIK, M.E.:
Nicotine and smoking.
In: Handbook of Psychopharmacology. Vol. 11, Iversen, L.L.,
Iversen, S.D., Snyder, S.H. (eds.), Plenum Press,
New York 1978, p. 425-464.

GRUBNER, O., FIRST, M.W., HUBER, G.L.:
Gas chromatographic determination of nicotine in gases
and liquids with suppression of adsorption effects.
Anal. Chem. 52, 1755-1758 (1980).

GRUENKE, L.D., BEELEN, T.C., CRAIG, J.C., PETRAKIS, N.L.:
The determination of nicotine in biological fluids at
picogram levels by selected ion recording.
Anal. Biochem. 94, 411-416 (1979).

GRUSZ-HARDAY, E.:

Tödliche Nicotinvergiftungen.

Arch. Toxikol. 23, 35-41 (1967).

GÜLKER, H., HEUER, H.:

Untersuchungen zur Wirkung von Nicotin auf Hämodynamik und Sauerstoffverbrauch des Herzens nach akuter und chronischer Sympathikolyse und nach Atropin.

Arzneim.Forsch. 31, 48-53 (1981).

HÄGGENDAL, J. , HENNING, M.:

Effect of chronically administered nicotine on axonal transport of dopamine- β -hydroxylase in peripheral adrenergic neurons and on blood pressure and heart rate in the rat.

Acta Physiol. Scand., Suppl. 479, 35-38 (1980).

HALL, G.H., MYERS, R.D.:

Hypothermia produced by nicotine perfused through the cerebral ventricles of the unanesthetized monkey.

Neuropharmacology 10, 391-398 (1971).

HALL, G.H.:

Effects of nicotine on thermoregulatory systems in the hypothalamus.

In: The Pharmacology of Thermoregulation. Schönbaum, E., Lomax, P. (eds.), Karger, Basel 1973, p. 244-254.

HARTVIG, P., AHNVELT, N.-O., HAMMARLUND, M., VESSMAN, J.:

Analysis of nicotine as a trichloroethyl carbamate by gas chromatography with electron-capture detection.

J. Chromatogr. 173, 127-138 (1979).

HENSCHLER, D.:

Tabak. Stoffwechselwirkungen.

In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 3. Auflage, Forth, W., Henschler, D., Rummel, W. (Hrsg.), Bibliographisches Institut, Mannheim 1980, S. 635.

HIGUCHI, T.:

Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices.

J. Pharm. Sci. 52, 1145-1149 (1963).

HIMMS-HAGEN, J.:

Sympathetic regulation of metabolism.

Pharmacol. Rev. 19, 367-461 (1967).

HOROWITZ, J.M., HORWITZ, B.A.:

An overview of neural models postulated for Thermoregulation.

In: Body Temperature. Lomax, P., Schönbaum, E. (eds.), Marcel Dekker, New York 1979, p. 25-37.

HUBBARD, J.E., GOHD, R.S.:

Tolerance development to the arousal effects of nicotine.

Pharmacol. Biochem. Behav. 3, 471-476 (1975).

HUBERMAN, H.S., EISON, M.S., SMITH BRYAN, K.,

ELLISON, G.:

A slow-release silicone pellet for chronic amphetamine administration.

Eur. J. Pharmacol. 45, 237-242 (1977).

ISAAC, P.F., RAND, M.J.:

Cigarette smoking and plasma levels of nicotine.

Nature (Lond.) 236, 308-310 (1972).

JAFFE, J.H.:

Nicotine and tobacco.

In: The Pharmacological Basis of Therapeutics. 6th edition,

Goodman, L.S., Gilman, A. (eds.), MacMillan,

New York 1980, p. 557-560.

JOHNSTON, L.M.:

Tobacco smoking and nicotine.

Lancet 1942/2, 742 (1942).

JONES, J.J., LEE, J.:

The value of rats with hereditary hypothalamic diabetes insipidus for the bioassay of vasopressin.

J. Endocrinol. 37, 335-344 (1967).

KALANT, H., LeBLANC, A.E., GIBBINS, R.J.:

Tolerance to, and dependence on, some non-opiate psychotropic drugs.

Pharmacol. Rev. 23, 135-191 (1971).

KHOSLA, T., LOWE, C.R.:

Obesity and smoking habits.

Brit. med. J. 1971/4, 10-13 (1971)

KOENIG, P.:

Die Entdeckung des reinen Nikotins.

Arthur Geist Verlag, Bremen 1940.

KREUZIGER, H., HEINECKER, R., KEMPER, F.:

Über den Einfluß des Zigarettenrauchens auf den Kreislauf.

Z. Kreislaufforsch. 44, 879-888 (1955).

KOZLOWSKI, L.T.:

The role of nicotine in the maintained use of cigarettes.

Drug Merchandising 1980, 36-43 (1980).

LANGLEY, J.N., DICKINSON, W.L.:

On the local paralysis of peripheral ganglia, and on the connexion of different classes of nerve fibres with them.

Proc. Roy. Soc. (Lond.) 46, 423-431 (1889).

LARSON, P.S., HAAG, H.B., SILVETTE, H.:

Tobacco. Experimental and Clinical Studies.

Williams and Wilkins, Baltimore 1961.

LEWIS, A.A.G., CHALMERS, T.M.:

A nicotine test for the investigation of diabetes insipidus.

Clin. Sci. (Lond.) 10, 137-144 (1951).

LICKINT, F.:

Tabak und Organismus. Handbuch der gesamten Tabakkunde.

Hippokrates Verlag, Stuttgart 1939.

LOTZ, W., SYLLWASSCHY, B.:

Release of oligopeptides from silicone rubber implants in rats over periods exceeding ten days.

J. Pharm. Pharmacol. 31, 649-650 (1979).

MANSNER, R.:

Relation between some central effects of nicotine and its brain levels in the mouse.

Ann. Med. exp. Biol. Fenn. 50, 205-212 (1972).

MANSNER, R., ALHAVA, E., KLINGE, E.:

Nicotine hypothermia and brain nicotine and catecholamine levels in the mouse.

Med. Biol. 52, 390-398 (1974).

MANSNER, R., MATTILA, M.J.:

Nicotine induced tremor and antidiuresis and brain nicotine levels in the rat.

Med. Biol. 53, 169-176 (1975).

MAREN, T.H.:

Pharmacology of nicotine: antipyretic, renal and adrenocorticotrophic effects.

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 77, 521-523 (1951).

MATTILA, M.J., AHTEE, L., SAARNIVAARA, L.:

The analgesic and sedative effects of nicotine in white mice, rabbits and golden hamsters.

Ann. Med. exp. Fenn. 46, 78-84 (1968).

MILLER, R.P., ROTENBERG, K.S., ADIR, J.:

Effect of dose on the pharmacokinetics of intravenous nicotine in the rat.

Drug Metabol. Dispos. 5, 436-443 (1977).

MILTON, A.S.:

The effect of nicotine on blood glucose levels and plasma non-esterified fatty acid levels in the intact and adrenalectomized cat.

Brit. J. Pharmacol. 26, 256-263 (1966).

MROSOVSKY, N., POWLEY, T.L.:

Set points for body weight and fat.

Behav. Biol. 20, 205-223 (1977).

MÜNSTER, G., BÄTTIG, K.:

Nicotine-induced hypophagia and hypodipsia in deprived and in hypothalamically stimulated rats.

Psychopharmacologia (Berl.) 41, 211-217 (1975).

NAQUIRA, D., ARQUEROS, L.:

Water intake in rats affected by addition of nicotine to drinking water.

Acta physiol. Lat. Amer. 28, 73-76 (1978).

NEUWEILER, W., RICHTER, R.H.H.:

Über die Wirkung von Nikotin auf die Fertilität männlicher und weiblicher Ratten.

In: Beiträge zur Fertilität und Sterilität. Dritte Folge. Beilageheft zur Zeitschrift für Geburtshilfe Bd. 157, S. 5-10 (1961).

NIELSEN, E.B., ELLISON, G.:

A silicone pellet for longterm continuous administration of amphetamine.

Commun. Psychopharmacol. 4, 17-20 (1980).

OPITZ, K.:

Tachyphylaxie, Gewöhnung und Sucht bei Amphetaminen und Ephedrinen.

Internist. Prax. 13, 527-534 (1973).

OPITZ, K., HORSTMANN, M.:

Nicotin. Pharmakologie eines abhängigmachenden Stoffes.
Dtsch. Arztebl. 78, 1869-1873 (1981).

PENICAUD, L., LE MAGNEN, J.:

Recovery of body weight following starvation or food
restriction in rats.

Neurosci. Biobehav. Rev. 4, Suppl. 1, 47-52 (1980).

PERT, A.:

The cholinergic system and nociception in the primate:
interactions with morphine.

Psychopharmacologia (Berl.) 44, 131-137 (1975).

PHAN, D.V., DODA, M., BITE, A., GYÖRGY, L.:

Antinociceptive activity of nicotine.

Acta physiol. Acad. Sci. Hung. 44, 85-93 (1973).

QUIN, L.D.:

Separation of some tobacco alkaloids by gas chromatography.
Nature (Lond.) 182, 865 (1958).

RAMAZZINI, B.:

Untersuchung von denen Kranckheiten der Künstler und
Handwercker,... (dt. Übers.) Moritz George Weidmann,
Leipzig 1718, S. 141.

RATZMANN, K.P., MEYER, L.W., RIEMER, D.:

Untersuchungen zum Mechanismus der durch Nikotin in-
duzierten Lipolyse beim Menschen.

Z. inn. Med. 29, 410-413 (1974).

REAVES, T.A., HAYWARD, J.N.:

Hypothalamic and extrahypothalamic thermoregulatory centers.

In: Body temperature. Lomax, P., Schönbaum, E. (eds.), Marcel Dekker, New York 1979, p. 39-70.

REIMANN, I.:

Beeinflussung des provozierten Morphin-Entzugssyndroms durch Substanzen mit zentral nutritiv-regulatorischer Wirkung.

Inaugural-Dissertation, Med. Fakultät, Münster 1977.

RIEGELMAN, S., LOO, J.C.K., ROWLAND, M.:

Shortcomings in pharmacokinetic analysis by conceiving the body to exhibit properties of a single compartment. J. Pharm. Sci. 57, 117-123 (1968).

ROBINSON, J.R.:

Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems. Marcel Dekker, New York 1978.

ROSENBERG, J., BENOWITZ, N.L., JACOB, P.:

Disposition kinetics and effects of intravenous nicotine. Clin. Pharmacol. Ther. 28, 517-522 (1980).

ROTTENSTEIN, H., PEIRCE, G., RUSS, E., FELDER, D., MONTGOMERY, H.:

Influence of nicotine on the blood flow of resting skeletal muscle and of the digits in normal subjects. Ann. N. Y. Acad. Sci. 90, 102-113 (1960).

RUDDON, R.W., COHEN, A.M.:

Alteration of enzyme activity in rat liver following the acute and chronic administration of nicotine. Toxicol. appl. Pharmacol. 16, 613-625 (1970).

RUSSELL, M.A.H., WILSON, C., PATEL, U.A.,
FEYERABEND, C., COLE, P.V.:

Plasma nicotine levels after smoking cigarettes with
high, medium, and low nicotine yields.
Brit. med. J. 1975/2, 414-416 (1975).

RUSSELL, M.A.H., FEYERABEND, C.:

Cigarette smoking: a dependence on high-nicotine boli.
Drug Metabol. Rev. 8, 29-57 (1978).

SAHLEY, T.L., BERNITSON, G.G.:

Antinociceptive effects of central and systemic ad-
ministrations of nicotine in the rat.
Psychopharmacology 65, 279-283 (1979).

SAYERS, DOROTHY L.:

The poisoned Dow '08.

In: Hangman's Holiday. New English Library, London 1978.

SCHECHTER, M.D., ROSECRANS, J.A.:

Behavioral tolerance to an effect of nicotine in the rat.
Arch. int. Pharmacodyn. 195, 52-56 (1972).

SCHECHTER, M.D., COOK, P.G.:

Nicotine-induced weight loss in rats without an effect
on appetite.
Eur. J. Pharmacol. 38, 63-69 (1976).

SCHMIDT, F.:

Die Gesundheitsschäden des Zwangsrauchens.
Fortschr. Med. 97, 1920-1927 (1979).

SCHMITTHENNER, J.E., HAFKENSCHIEL, J.B., FORTE, I.,
RIEGEL, C.:

The effects of nicotine on left ventricular work and
coronary blood flow.

Amer. J. med. Sci. (Phil.) 234, 487-488 (1957).

SEEVERS, M.H.:

Termination of drug action by tolerance development.

Fed. Proc. 17, 1175-1181 (1958).

SHAW, J.E.:

Drug delivery systems.

In: Annual Reports in Medicinal Chemistry. Hess, H.-J.
(ed.), Volume 15, Academic Press, New York 1980,
p. 302-315.

SMITH, C.S., ROSENFELD jr., S., SACKS, L.J.:

Study of the effect of nicotine in the albino rat.

J. Pharmacol. exp. Ther. 55, 274-287 (1935).

SPOHR, U., HOFMANN, K., STECK, W., HARENBERG, J.,

WALTER, E., HENGEN, N., AUGUSTIN, J., MÖRL, H.,

KOCH, A., HORSCH, A., WEBER, E.:

Evaluation of smoking-induced effects on sympathetic,
hemodynamic and metabolic variables with respect to
plasma nicotine and COHb levels.

Atherosclerosis 33, 271-283 (1979).

STAEMMLER, M.:

Die chronische Vergiftung mit Nicotin. Ergebnisse
experimenteller Untersuchungen an Ratten.

Virchows Arch. (Berl.) 295, 360-390 (1935).

STALHANDSKE, T.:

Effects of increased liver metabolism of nicotine on its uptake, elimination and toxicity in mice.

Acta Physiol. Scand. 80, 222-234 (1970).

STALHANDSKE, T., SLANINA, P.:

Effect of nicotine treatment on the metabolism of nicotine in the mouse liver in vitro.

Acta pharmacol. toxicol. (Kbh.) 28, 75-80 (1970).

STATISTISCHES BUNDESAMT (Hrsg.):

Statistisches Jahrbuch für die Bundesrepublik Deutschland. Kohlhammer, Stuttgart 1980, S. 187.

STILLE, G., COPER, H.:

Spezielle Fragen der Langzeittherapie. Die praeklinische Erfassung eines Abhängigkeitspotentials bei neuen Arzneimitteln.

In: AMI-Berichte I/1980. Schnieders, B., Grosdanoff, P. (Hrsg.), Dietrich Reimer Verlag, Berlin 1980, S. 245-247.

STOCK, K., WESTERMANN, E.:

Biogene Amine im Fettgewebe.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol. 246, 15-16 (1963).

STOLERMAN, I.P., FINK, R., JARVIK, M.E.:

Acute and chronic tolerance to nicotine measured by activity in rats.

Psychopharmacologia (Berl.) 30, 329-342 (1973).

STOLERMAN, I.P., BUNKER, P., JARVIK, M.E.:

Nicotine tolerance in rats; role of dose and dose interval.
Psychopharmacologia (Berl.) 34, 317-324 (1974).

SUPEK, Z., EISEN, V.:

The action of nervous depressants on the antidiuretic
and chloruretic effect of nicotine.

Arch. int. Pharmacodyn. 93, 75-82 (1953).

SURGEON GENERAL:

Smoking and Health.

U.S. Government Printing Office, Washington D.C. 1979.

WADA, E., KISAKI, T., SAITO, K.:

Autoxidation of nicotine.

Arch. Biochem. Biophys. 79, 124-130 (1959).

WATSON, I.D.:

Rapid analysis of nicotine and cotinine in the urine
of smokers by isocratic high-performance liquid chromatography.

J. Chromatogr. 143, 203-206 (1977).

WEBER, R.P., COON, J.M., TRIOLO, A.J.:

Nicotine inhibition of the metabolism of 3,4-benzopyrene,
a carcinogen in tobacco smoke.

Science (Wash.) 184, 1081-1083 (1974).

WENZEL, D.G., BROADIE, L.L.:

Stimulatory effect of nicotine on the metabolism of
meprobamate.

Toxicol. appl. Pharmacol. 8, 455-459 (1966).

WERLE, E., BECKER, H.W.:

Über eine Mikromethode zur Bestimmung von Nicotin und ihre Anwendung zur Untersuchung der fermentativen Nicotinentgiftung durch tierisches Gewebe.

Biochem. Z. 313, 182-191 (1942).

WERLE, E., USCHOLD, E.:

Über fermentative Nicotinentgiftung durch tierisches Gewebe,

Biochem. Z. 318, 531-537 (1948).

WESTFALL, T.C., BRASE, D.A.:

Studies on the mechanism of tolerance to nicotine-induced elevations of urinary catecholamines.

Biochem. Pharmacol. 20, 1627-1635 (1971).

WIRTH, W., GLOXHUBER, C.:

Toxikologie für Ärzte, Naturwissenschaftler und Apotheker. 3. Auflage, Thieme, Stuttgart 1981, S.273.

WOOLFE, G., MacDONALD, A.D.:

The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol).

J. Pharmacol. exp. Ther. 80, 300-307 (1944).

YAMAMOTO, I., NAGAI, K., KIMURA, H., IWATSUBO, K.:

Nicotine and some carcinogens in special reference to the hepatic drug-metabolizing enzymes.

Jap. J. Pharmacol. 16, 183-190 (1966).

YATES, F.E. (ed.):

Specifications for the alzet^R osmotic minipump - model 1701.

Special Delivery, Alzet^R Osmotic Minipump Technical Bulletin 1, No.1, 2-3 (1977).

YATES, F.E. (ed.):

A new alzet^R osmotic minipump: model 2001.

Special Delivery, Alzet^R Osmotic Minipump Technical
Bulletin 3, No.2, 1-2 (1979 a).

YATES, F.E. (ed.):

Announcing minipump model 2002.

Special Delivery, Alzet^R Osmotic Minipump Technical
Bulletin 3, No.3, 1 (1979 b).

11. Allgemeine Formelzeichen

- Pharmakokinetik:

- α - Geschwindigkeitskonstante für den Umverteilungsprozeß,
- β - Geschwindigkeitskonstante für den Eliminationsprozeß,
- b - Konzentration im Blutplasma,
- b_{ss} - "steady state"-Konzentration im Blutplasma,
- C - Konzentration (allgemein) zur Zeit t ,
- C_0 - Konzentration zur Zeit $t = 0$,
- C_1 - Koeffizient für die Umverteilungsphase,
- C_2 - Koeffizient für die Eliminationsphase,
- C_{tot} - totale Clearance (siehe Seite 85),
- e - Basis des natürlichen Logarithmus,
- k - Zeitkonstante erster Ordnung (allgemein),
- k^0 - Zeitkonstante nullter Ordnung (allgemein),
- k_a - Invasionskonstante (k_a^0 - Infusionsrate),
- k_e - Eliminationskonstante,
- k_{TB}, k_{BT} - Umverteilungskonstanten,
- t - Zeit seit Beginn der Stoffzufuhr,
- $t_{(1/2)}$ - Biologische Halbwertszeit,
- V - (fiktives) Volumen des inneren Kompartiments B.

- sonstige Zeichen:

- B - Zeitkonstante in Gleichung 11,
- $C_{(i,a)}$ - Konzentration (i - innen, a - außen),
- C_{ss} - Konzentration im "steady state",
- dC/dx - Konzentrationsgradient (Differentialquotient aus Konzentration und Weg in Diffusionsrichtung),
- D - Diffusionskoeffizient,
- D_K - Kugeldurchmesser,
- dD_K/dt - Geschwindigkeit, mit der der Kugeldurchmesser abnimmt,
- D_{OK} - Kugeldurchmesser zur Zeit $t = 0$,
- D_O - temperaturunabhängiger Faktor in Gleichung 24,
- d - Membrandicke,
- E - Extinktion bei 259,5 nm (Schichtdicke 10 mm),
- E_D - Aktivierungsenergie,
- k - Konstante allgemein,
- M - Masse,
- M_O - Masse zur Zeit $t = 0$,
- n - Anzahl der Mole Substanz,
- dn/dt - Diffusionsgeschwindigkeit (Differentialquotient aus Anzahl der Mole Substanz und Zeit),
- P - Permeabilität,
- Q - Fläche senkrecht zur Diffusionsrichtung (Querschnittsfläche),

- Q' - Lochquerschnittsfläche, gemessen an der Innenseite des Schlauches am NAS,
- ρ - Dichte,
- r - Radius, speziell Lochradius des NAS,
- $R_{(i,a)}$ - Radius allgemein (i - innen, a - außen),
- R' - Radius der wirkstoffgesättigten Innenkugel (Abbildung 6 auf Seite 21),
- R_T - allgemeine Gaskonstante,
- S - Löslichkeit ("solubility"),
- T - Temperatur,
- t - Zeit,
- t_L - "lag"-Zeit (verzögerte Abgabe zu Beginn der Diffusion),
- V_I - Volumen der Inkubationsflüssigkeit,
- x - Wegstrecke in Diffusionsrichtung.

12. Lebenslauf

Am 9. Mai 1955 wurde ich als der ältere von zwei Söhnen des Finanzbeamten Dr. jur. Walter Horstmann und seiner Frau Marga, geb. Weritz, in Essen geboren.

Vom 25. April 1962 an besuchte ich die katholische Volksschule "Am krausen Bäumchen" in Essen-Bergerhausen und wechselte im April 1966 auf das mathematisch-naturwissenschaftliche Helmholtz-Gymnasium in Essen-Rüttenscheid über. Dort legte ich am 12. Juni 1974 die Reifeprüfung ab.

Vom 9. Oktober 1974 bis zum 5. April 1978 studierte ich Pharmazie in Marburg/Lahn. Mit dem Bestehen der Zweiten Pharmazeutischen Prüfung am 31. März 1978 war dieser Teil meiner Ausbildung abgeschlossen.

In dem sich unmittelbar anschließenden Praktikantenjahr war ich zunächst - bis Oktober 1978 - in der Engel-Apotheke in Mülheim/Ruhr (Dr. H. und Dr. M. Ulbrich) tätig. Im darauffolgenden Halbjahr beschäftigte ich mich in der Galenischen Entwicklungsabteilung der Beiersdorf AG in Hamburg mit fließtechnischen Problemen in der Pulvertechnologie und der Beeinflussung von physikalischen Stoffeigenschaften durch Sprühtrocknung. Nach bestandener Dritter Staatsprüfung erhielt ich am 13. Juni 1979 die Approbation als Apotheker.

Seit dem 1. April 1979 bin ich in der Abteilung für Pharmakologie des Stoffwechsels des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie in Münster (seit dem 1. Oktober 1979 als Verwalter einer halben wissenschaftlichen Assistentenstelle) tätig.

13. Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. med. K. Opitz, der stets bereit war, mit Rat und Tat zu helfen. Sein "ansteckendes" wissenschaftliches Engagement und der Freiraum, den er mir gewährte, haben gleichermaßen dazu geführt, daß die Arbeit auch mit schöpferischer Freude verbunden war.

Herrn Prof. Dr. med. F.H. Kemper, dem Direktor des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Universität, sei für die Schaffung der materiellen Voraussetzungen für diese Dissertation gedankt.

Als erfahrener Analytiker trug Herr Diplom-Chemiker Dr. R. Eckard wesentlich zum Gelingen der Nicotinbestimmung im Blut der Ratte bei; ihm sei an dieser Stelle ebenfalls gedankt.

Danken möchte ich auch meinen Mitdoktoranden B. Beckermann, U. Hartig, C. Kolodziej und G. Schulte-Daxböck sowie den technischen Assistentinnen E. Middendorf und A. Puklowski für gelegentliche Hilfeleistungen bei tierexperimentellen Arbeiten.

